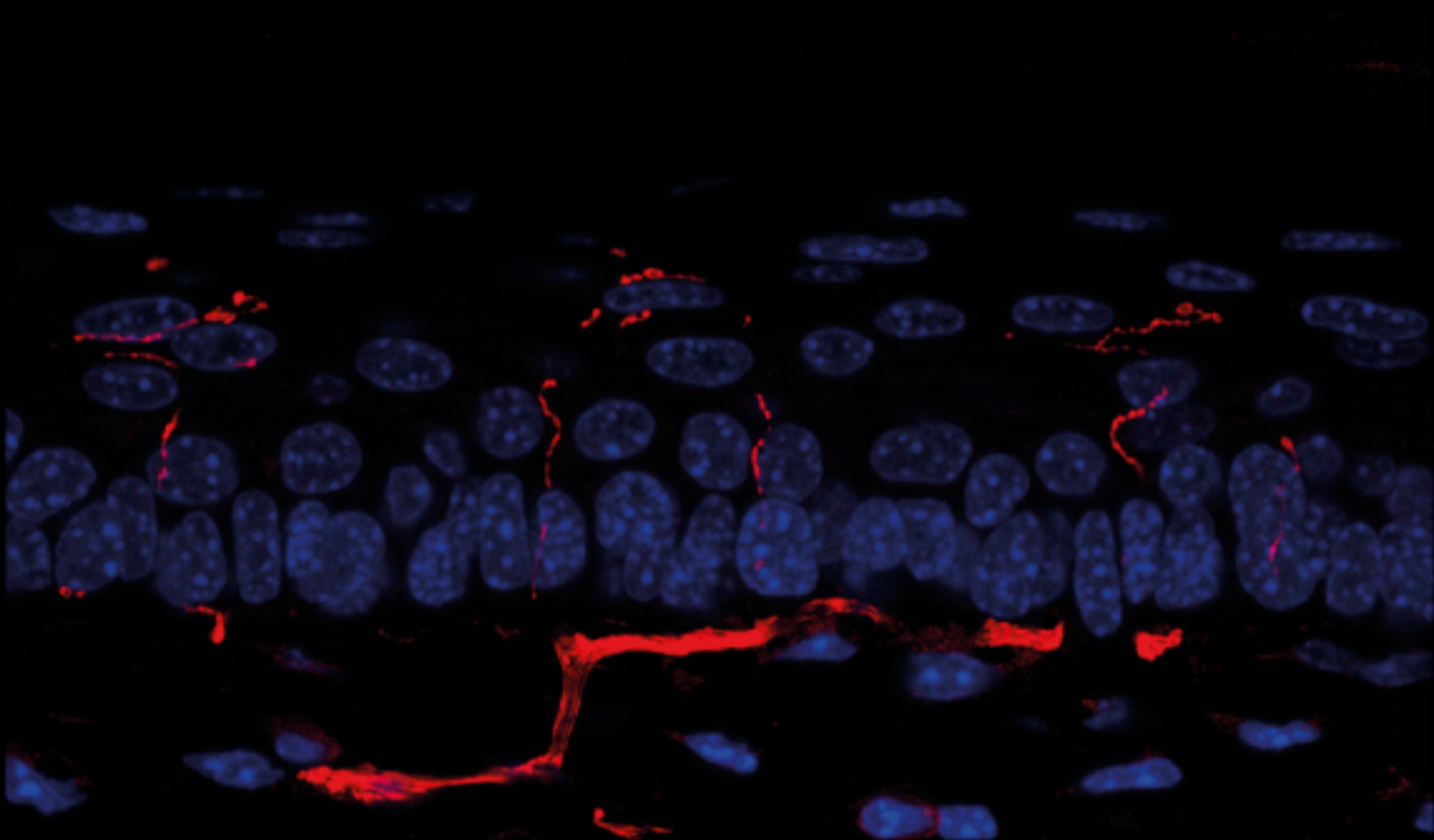


Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth asociada a *Gdap1*: alteraciones en nocicepción y señalización por calcio

Paula Martínez Valero



Universidad Autónoma de Madrid
Facultad de Ciencias

Departamento de Biología Molecular

Doctorado en Bioquímica, Biología
Molecular, Biomedicina y Biotecnología

TESIS DOCTORAL
Madrid, 2017



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Departamento de Biología Molecular

Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth asociada a *Gdap1*:
alteraciones en nocicepción y señalización por calcio

Paula Martínez Valero

Madrid, 2017

Departamento de Biología Molecular

Facultad de Ciencias

Universidad Autónoma de Madrid

Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth asociada a *Gdap1*: alteraciones en nocicepción y señalización por calcio

Memoria presentada por la licenciada en Biotecnología Paula Martínez Valero para optar al título de Doctor en Ciencias en la modalidad de formato clásico bajo la supervisión de:

Directora de la tesis:

Codirectoras de la tesis:

Dra. Jorgina Satrústegui Gil-Delgado

Dra. Laura Contreras Balsa

Dra. Carolina L. Roza Fernández
de Caleyá

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Biología Molecular, Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (C.S.I.C. – U.A.M.). La realización de esta Tesis ha sido posible gracias a un Contrato Predoctoral como Personal Investigador del Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER) con cargo a un proyecto del Consorcio Europeo TREAT-CMT, y a Contratos Predoctorales de la Universidad Autónoma de Madrid y la Fundación Severo Ochoa.

A mis padres, Benjamín y M^a Ángeles, y a mi hermana Clara. Si hoy estoy aquí y soy lo que soy es gracias a ellos, que me han apoyado incondicionalmente de todas las formas posibles. Echando la vista atrás uno se pregunta muchas veces si habría sido mejor tomar este camino o aquel, si las cosas podrían ser diferentes, si se han cometido errores. Puede parecer infantil o ingenuo pero considero que ellos son los mejores padres, la mejor hermana. Les agradezco su amor a lo largo de toda mi vida, su ayuda y consejo. Nunca dejarán de preocuparse por mí, pero me han dado la libertad de elegir mi propio camino apoyándome en todo momento. Podría escribir y escribir sobre ellos, pero resumiendo decir que vosotros sois siempre los primeros.

A mis abuelos, especialmente a mi abuela Sacri que no llegó a ver como empezaba esta aventura que es la tesis pero de la que siempre me acuerdo y a la que echo de menos. Al resto de mi familia, tíos y primos: aunque no sepáis muy bien qué es lo que hago, sabéis que para mí lo primero cuando voy a casa es una comida familiar. Algunos de vosotros estáis más cerca y otros estáis ahora más lejos que nunca, pero siempre tenéis una llamada o un mensaje interesándoos por mí.

A todos los amigos desde Albacete a Madrid, pasando por Valencia y Alicante, con los que he compartido tantas cosas... A los “despegaos” Fede y Jesús, mis albaceteños compañeros de biotecnología, cuando ni nosotros teníamos claro qué era eso, y mejores amigos desde entonces. A mis amigas de cena y cine, y de fiesta y feria, Itea, Irene y Laila. A Leyre, mi amiga y compi en todos los sentidos, y a Alba. A los viejos amigos de la carrera cada uno en un lugar del mundo, y los otros amigos con los que aún recorro un poco el mundo cuando cuadran las agendas. A mis más recientes incorporaciones del máster, Alex, Inma y Sara, gracias por esas sesiones de poleo y apoyo en grupo.

Seguro que me dejo a mucha gente, pero los que me conocen bien sabrán perdonar mi memoria de 5 segundos.

Y el principal agradecimiento es a Ina, sin la cual nada de esto habría sido posible. Gracias por aceptarme en el laboratorio recién salida de un máster en neurociencias cuando ya casi no me acordaba de aquella bioquímica de la carrera que decía que la mitocondria era tan importante. Gracias por tu gran paciencia y apoyo, por todo lo que he aprendido estos años.

A mi codirectora Laura, por todo lo que me ha enseñado y lo muchísimo que ha trabajado para que este proyecto siguiera adelante. A mi nueva codirectora Carolina, que se ha implicado tanto en este trabajo y ha aportado su experiencia y sus ideas en un campo tan alejado del nuestro, muchas gracias por tu simpatía y cariño.

A toda la gente con la que hemos colaborado y nos han ayudado en un sentido u otro: a Jorge R. Cabrera (actualmente allí lejos en los EEUU) por todo lo que me enseñó en los primeros tiempos de mi tesis, por su amistad y ayuda; a José Antonio López García y el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá; a Francesc Palau y su grupo (especialmente a Azahara cuyo trabajo nos ha ayudado también en nuestra investigación); a José Ramón Naranjo del CNB, por su consejo y por prestarnos su equipo de *plantar test* que nos ha resultado imprescindible; a la gente del consorcio TREAT-CMT y del CIBERER; al personal del SMOC del CBMSO por su valiosísima ayuda y por estar siempre disponibles con una sonrisa; a Maite Rejas y el Servicio de Microscopía Electrónica del CBMSO.

Gracias a los que me permitieron tener el primer contacto con el CBM aunque luego acabara en otra planta y con otro tema totalmente distinto: a Francisco Wandosell y su grupo, a Lara; a Leonor Kremer del CNB y su grupo, a Mayte.

Gracias a los amigos y compañeros del 326, los Cuezva, con los que mantenemos una relación que viene de tiempos inmemoriales pero se va renovando conforme cambian las generaciones y se comparten cabinas de cultivos, consultas, productos, paseos cruzando el pasillo y fiestas varias. Gracias a toda la gente del CBM con los que he tenido más o menos relación, desde préstamos de equipos y negociaciones por el calendario de comportamiento (grupo de José Lucas); temas del animalario, de instrumentación o de mantenimiento; ayuda con protocolos o productos; o simplemente conversaciones y risas en cultivos, en la cafetería, en el comedor o en los pasillos.

Y finalmente gracias a mi segunda familia en el laboratorio. A José María Carrascosa y Elena Bogóñez. A Araceli que sabe de todo y en todo te puede ayudar, que se ríe de mí y me recuerda una y otra vez quién es cada cual, qué es lo que hacen, de dónde vienen y a dónde van. A Bea que me ha ayudado en los temas de neuro y con la que siempre te echas unas risas. A Bárbara por toda su ayuda y a Isabel porque aunque dejé de sentarme a su lado sigo mareándola con los ratoncillos. A Nacho, con el que coincidí poco pero precisamente me acuerdo de la defensa de su tesis como si fuera ayer. A Carlos, que fue el primero que trabajó en esto del Charcot-Marie-Tooth y *Gdapl*, y dejó el testigo primero a su becaria Paloma y luego a la becaria de su becaria, yo. También me acuerdo como si fuera ayer de cuando fui por primera vez al laboratorio a hacer la entrevista y verte justo a ti el primero al entrar, sentado en tu sitio frente a la puerta. A Irene “primera”, gracias por ayudarme tanto, en todo lo que fuera necesario y desde el primer momento, por tu amistad, por tu simpatía y cariño, por tus comidas tan ricas, por presentarnos a Bea. Se te echa tanto de menos desde que te fuiste del labo... menos mal que hemos

comprobado que en tu casa de Dublín cabemos todas y que tú estás dispuesta a venir a tomar un café al CBM sólo por vernos. Gracias también a todos los estudiantes que han ido pasando por el laboratorio y a los que todavía están por aquí.

A Paloma no sé ni por dónde empezar a darle las gracias, son tantísimas cosas... ella ha sido mi “profe”, mi compañera de proyecto, mi vecina de poyata y de escritorio, mi amiga. Ella me ha enseñado, me ha aconsejado, me ha ayudado y apoyado. Y en estos últimos meses que hemos ido a la par con la tesis para mi has sido el mejor equipo, más que nunca. Gracias a Carmen que, aunque ya no esté con nosotras en el lab, se ha convertido en una de mis mejores amigas y me ha ayudado y apoyado tanto. El mundo sería muy triste sin ti que has ido juntando amigos y haciéndoles reír desde 1988. Gracias a Inés, la “veterana” del grupo (¿cuándo dices que entraste en el laboratorio?), la super motivada por la ciencia, la inconformista y luchadora, la que dice que vivo en Mordor (aunque luego le venga tan bien que le acerque a Renfe) y se ríe de mí cuando digo “aseo”. Y por último gracias a Irene “segunda”, que siempre está dispuesta a ayudar en todo y luego se come los marrones, que me ha ayudado tanto últimamente cuando yo ya estaba pre-tésica, y que es un encanto de persona en todos los sentidos.

Verdaderamente vosotras sois sin duda mi familia, y no sólo porque estos años haya pasado más tiempo con vosotras que con nadie, así que todo lo que falta por decir y agradecer creo que ya lo sabéis.

Siempre dicen que los agradecimientos es lo primero que se escribe de la tesis, en mi caso no ha sido así, ha sido prácticamente lo último. Quería dejarlo para el final, porque ha costado mucho pero aquí estamos por fin.

RESÚMENES

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) es el desorden neurológico hereditario más común. Afecta predominantemente al sistema nervioso periférico. Las mutaciones en el gen de la proteína 1 asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos (GDAP1) causan diferentes formas de CMT. La deficiencia en GDAP1 en varias líneas celulares causa una reducción en la entrada de Ca^{2+} a través de un mecanismo conocido como entrada de calcio operada por depósito (SOCE) debido a una mala localización de las mitocondrias cercanas, lo que a su vez afecta a la respiración mitocondrial.

Los estudios sobre sensibilidad en ratones deficientes en GDAP1 mostraron una reducción en la sensibilidad nociceptiva no asociada a alteraciones motoras. Este defecto no está causado por cambios en las terminales nerviosas libres cutáneas, pero las aferencias primarias nociceptivas registradas electrofisiológicamente muestran un umbral más alto a los estímulos mecánicos en estos animales.

Los estudios en cultivos primarios de neuronas de ganglios de raíz dorsal (DRG), muestran que tanto la señalización por calcio como la liberación de neurotransmisores evocadas por capsaicina (que activa específicamente nociceptores) están aumentadas en ratones *Gdap1*-KO. El contenido de Ca^{2+} del RE y la actividad SOCE están disminuidas en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO. Esto se acompaña de un aumento de la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (VGCCs) tras la activación del SOCE, e inhibidores específicos del SOCE (que inhiben la salida de Ca^{2+} de RE) reproducen la deficiencia en GDAP1. Por tanto, una menor movilización de los sensores de Ca^{2+} del RE (STIM1/2) hacia la membrana plasmática causaría un doble efecto: menor actividad SOCE y menor inhibición de los VGCCs. Es interesante que la disminución en la actividad SOCE reduce las señales de calcio mitocondriales, en particular en las neuritas.

Las señales de Ca^{2+} debidas al SOCE y a la liberación de Ca^{2+} del RE estimulan la respiración mitocondrial. Nuestros resultados muestran que los DRGs en ratones *Gdap1*-KO poseen menor potencial de membrana mitocondrial basal y menor estimulación de la respiración evocada por estímulos nociceptivos.

La alteración en la homeostasis del calcio causa la apertura del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP). El PTP provoca disfunción mitocondrial y, en consecuencia, muerte celular. Desarrollamos un sistema experimental para detectar alteraciones en el PTP en fibroblastos aislados de pacientes de enfermedades mitocondriales así como en fibroblastos embrionarios de ratón. Observamos que con este protocolo podemos detectar con éxito un estado de susceptibilidad al PTP o estado “*PTP prone*” en sistemas celulares en los que hay descritas alteraciones en el PTP, como MEFs *SCaMC3*-KO y *ADCK2*-HT. Además los MEFs procedentes de ratones *Gdap1*-KO son más susceptibles a una apertura temprana del PTP, con la consecuente muerte celular. Aunque el ratón doble KO (*SCaMC-3* y *Gdap1*) no desarrolla mayores déficits motores ni sensitivos que el *Gdap1*-KO, la sobreexpresión de *SCaMC-3* o de otros mecanismos protectores frente al PTP podrían mejorar el fenotipo del ratón.

Las neuronas *Gdap1*-KO podrían presentar una deficiencia energética durante su respuesta a agentes movilizadores del Ca^{2+} del RE así como a otras señales de Ca^{2+} , comprometiendo su función y la correcta transmisión sináptica. Además, nuestros resultados indican que las deficiencias en la homeostasis del Ca^{2+} y bioenergéticas y la alteración en la apertura del PTP podrían contribuir al déficit en el sistema nociceptivo observado en los ratones *Gdap1*-KO.

Charcot–Marie–Tooth (CMT) disease is the most common inherited neurological disorder. It affects predominantly the peripheral nervous system. Mutations in ganglioside-induced differentiation associated protein 1 (GDAP1) gene cause different forms of CMT. GDAP1 deficiency in several cell lines causes a reduction in Ca^{2+} inflow through a mechanism known as store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) due to a misallocation of nearby mitochondria, and this impacts mitochondrial respiration.

We have studied the sensory phenotype in a GDAP1 deficient mouse. We find that *Gdap1*-KO mice have reduced sensitivity to nociceptive stimuli independent of motor impairments. This defect is not caused by alterations in intra-epidermal free nerve endings in the paw skin, and single-fiber recordings from isolated skin showed higher threshold to mechanical stimuli in the *Gdap1*-KO.

In order to study in more detail the molecular mechanism altering nociceptor function we have used primary cultures of DRG neurons that contains the soma of the primary afferents. Our results show that both calcium signalling and neurotransmitter release evoked by capsaicin (which activates nociceptors specifically) was increased in *Gdap1*-KO. ER- Ca^{2+} content and SOCE activity decrease in *Gdap1*-KO DRG neurons. This is accompanied by an increase in voltage-gated Ca^{2+} channels (VGCCs) activity after SOCE activation. GDAP1 deficiency is mimicked by specific SOCE blockers that inhibit ER- Ca^{2+} release. Reduced mobilization of ER- Ca^{2+} sensors (STIM1/2) towards the plasmatic membrane may have a dual effect: reduced SOCE activity and decreased VGCCs inhibition. Interestingly, decreased SOCE activity lowers mitochondria calcium signals, particularly in neurites.

Ca^{2+} signals due to SOCE and ER- Ca^{2+} release stimulate mitochondrial respiration. Our results show that *Gdap1*-KO DRG neurons have lower mitochondrial membrane potential and stimulation of respiration due to nociceptive stimuli is also reduced in *Gdap1*-KO DRG neurons.

Altered calcium homeostasis causes opening of the mitochondrial permeability transition pore (PTP). PTP is implicated in many mitochondrial and rare diseases, causing mitochondrial dysfunction and eventually cell death. We have developed an experimental system to detect alterations in PTP in fibroblasts from patients with mitochondrial diseases and mouse embryonic fibroblasts. Our results show that this protocol successfully detects a *PTP prone* state in cellular systems with known alterations in PTP, such as *SCaMC3*-KO and *ADCK2*-HT MEFs. Our results show also that MEFs from *Gdap1*-KO mice are more susceptible to an early PTP opening, with the resulting cell death. Although a double KO mouse (*SCaMC-3* and *Gdap1*) does not further impair the motor behaviour and nociceptive sensitivity of the *Gdap1*-KO, it is still possible that the overexpression of *SCaMC-3* or other PTP-protective mechanisms may improve the phenotype of the mouse.

Gdap1-KO neurons may have an energy deficiency during their response to ER- Ca^{2+} mobilization and any Ca^{2+} signals which may compromise their function and proper synaptic transmission. In addition, our results indicate that deficient Ca^{2+} homeostasis and bioenergetics and altered PTP opening may contribute to the reduced nociception observed in *Gdap1*-KO mice.

ÍNDICE

I.	ABREVIATURAS	37
II.	INTRODUCCIÓN	45
1.	Enfermedades raras y enfermedades mitocondriales	45
1.1.	Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)	46
1.1.1.	Charcot-Marie-Tooth asociada a <i>GDAP1</i>	51
1.1.2.	Modelo murino de CTM asociada a <i>GDAP1</i>	53
2.	Mecanismos de transducción y transmisión del dolor	54
2.1.	Ruta de la señalización nociceptiva	55
2.2.	Señalización de Ca^{2+} en la aferencia primaria nociceptiva	56
3.	SOCE en deficiencia en GDAP1	58
3.1.	Homeostasis de calcio, mitocondria y SOCE	59
3.2.	GDAP1 y SOCE	61
4.	El calcio y la mitocondria	62
4.1.	El poro de transición de permeabilidad mitocondrial	63
4.2.	Metabolismo mitocondrial y calcio	65
III.	OBJETIVOS	71
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	77
1.	Experimentos con animales	77
1.1.	Animales	77
1.2.	Tests de comportamiento	78
1.2.1.	Test de Hargreaves (<i>Plantar Test</i>) (Sensibilidad nociceptiva térmica)	78
1.2.2.	Test de von Frey (Sensibilidad nociceptiva mecánica)	79
1.2.3.	Test rota-rod (Comportamiento motor)	81
1.3.	Inmunohistoquímica para el análisis de las terminaciones nerviosas libres (FNE)	82
1.4.	Estudios de electrofisiología en fibra única	82
1.4.1.	Obtención y mantenimiento de la preparación <i>skin-nerve</i>	82
1.4.2.	Procedimientos electrofisiológicos	83
2.	Cultivos primarios	85
2.1.	Cultivo primario de neuronas de ganglios de raíz dorsal (DRGs)	85

2.2.	Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo	86
2.3.	Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)	86
2.4.	Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de <i>ADCK2</i>	87
3.	Experimentos con células	87
3.1.	Tratamiento de las células con Fura2-AM para la determinación de Ca^{2+} citosólico ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cit.}}$)	87
3.1.1.	Estudio del mecanismo SOCE	88
3.1.2.	Estudio del contenido de Ca^{2+} del RE	89
3.1.3.	Estudio de la respuesta de TRPV1	89
3.1.4.	Estudio de la respuesta de calcio a H_2O_2	89
3.2.	Determinación de las señales de Ca^{2+} de la membrana plasmática ($\text{Ca}^{2+}_{\text{memb.}}$) y de la mitocondria ($\text{Ca}^{2+}_{\text{mit.}}$)	89
3.3.	Medida de la liberación de glutamato	90
3.4.	Medida del consumo de oxígeno celular (OCR)	91
3.4.1.	Estimulación de la respiración mitocondrial	92
3.5.	Medida de la capacidad de retención de calcio (CRC)	92
3.6.	Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)	93
3.6.1.	TMRM	93
3.6.1.1.	Cálculo del potencial basal	94
3.6.1.2.	Determinación de la apertura del PTP en célula única por pérdida del potencial de membrana ($\Delta\psi$)	94
	a) Oligomicina	94
	b) Agentes inductores	94
3.6.1.3.	Análisis de la morfología mitocondrial	94
3.6.2.	JC-1	95
3.7.	Medida de la muerte celular	95
3.7.1.	Muerte sensible a PTP	96
3.7.2.	Muerte independiente de PTP	96
4.	Análisis estadístico	96
V.	RESULTADOS	101
1.	Caracterización de la sensibilidad nociceptiva en los ratones <i>Gdap1-knock out</i> (<i>Gdap1</i> -KO)	101

1.1.	Los ratones <i>Gdap1</i> -KO muestran menor sensibilidad nociceptiva térmica y mecánica en ensayos de comportamiento <i>in vivo</i>	101
1.2.	Los ratones <i>Gdap1</i> -KO no presentan alteraciones en las terminaciones nerviosas libres	104
1.3.	Los ratones <i>Gdap1</i> -KO muestran alteraciones electrofisiológicas en respuesta a estímulos mecánicos	105
2.	Estudio del mecanismo molecular responsable de las alteraciones en la transmisión nociceptiva en los ratones <i>Gdap1</i> -KO	107
2.1.	Mecanismos de respuesta a estímulos nociceptivos en las neuronas de ganglios de raíz dorsal (DRGs)	107
2.1.1.	Las neuronas DRGs <i>Gdap1</i> -KO muestran alteraciones en la señalización nociceptiva por calcio y en la liberación de neurotransmisores	107
2.2.	Mecanismos de señalización celular mediados por calcio	110
2.2.1.	Las neuronas DRGs y las neuronas cerebelares procedentes de ratones <i>Gdap1</i> -KO muestran una menor actividad SOCE	111
2.2.2.	Las neuronas DRGs procedentes de ratones <i>Gdap1</i> -KO muestran una menor actividad basal de los VGCCs	116
2.2.3.	Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas DRGs y neuronas cerebelares	117
2.2.4.	Las neuronas DRGs y cerebelares <i>Gdap1</i> -KO tienen menores niveles de calcio del retículo endoplásmico	124
2.2.5.	La menor actividad SOCE de neuronas DRGs y cerebelares <i>Gdap1</i> -KO es especialmente relevante en las neuritas	126
2.2.6.	Las neuronas DRGs y las neuronas cerebelares <i>Gdap1</i> -KO muestran menor entrada de calcio a la mitocondria asociada a la menor activación del SOCE, siendo el defecto especialmente relevante en neuritas	127
2.2.7.	Las neuronas DRGs <i>Gdap1</i> -KO tienen menor potencial de membrana mitocondrial basal y menor estimulación de la respiración mitocondrial en respuesta a agentes movilizadores de Ca^{2+}	129
3.	Estudio de la implicación del poro de transición de permeabilidad (PTP) en modelos de enfermedades que afectan secundariamente a la mitocondria	131

3.1.	SCaMC-3	133
3.1.1.	Los fibroblastos murinos de ratón (MEFs) procedentes de ratones <i>SCaMC3</i> -KO tienen menor capacidad de retención de calcio	134
3.1.2.	Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i> -KO no muestran alteraciones en la respiración mitocondriales	135
3.1.3.	Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i> -KO son más susceptibles a la apertura del PTP	137
3.1.4.	Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i> -KO son más susceptibles a agentes inductores del PTP	139
3.1.5.	Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i> -KO son más susceptibles a la muerte causada por agentes inductores del PTP	141
3.2.	ADCK-2	142
3.2.1.	Los MEFs procedentes de ratones <i>ADCK2</i> -HT no muestran alteraciones en el $\Delta\Psi_{mit}$ basal ni en la morfología mitocondrial	143
3.2.2.	Los MEFs procedentes de ratones <i>ADCK2</i> -HT son más susceptibles a la apertura del PTP	144
3.3.	GDAP1	146
3.3.1.	Los MEFs procedentes de ratones <i>Gdap1</i> -KO no muestran alteraciones en la respiración mitocondrial	146
3.3.2.	Los MEFs procedentes de ratones <i>Gdap1</i> -KO son más susceptibles a la apertura del PTP	147
3.3.3.	Los MEFs procedentes de ratones <i>Gdap1</i> -KO son más sensibles a agentes inductores del PTP	148
4.	Caracterización de la sensibilidad nociceptiva en los ratones dobles <i>SCaMC-3</i> / <i>Gdap1</i>	149
VI.	DISCUSIÓN	159
1.	Nocicepción en la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth y en el ratón <i>Gdap1</i> -knock out (<i>Gdap1</i> -KO)	159
2.	Entrada de calcio operada por depósito (SOCE)	161
2.1.	SOCE y <i>Gdap1</i>	162
2.2.	SOCE, dolor neuropático y dolor crónico	165
3.	Función mitocondrial: impacto del calcio del RE y del SOCE	166
4.	El poro de transición de permeabilidad y enfermedades mitocondriales	167

VII.	CONCLUSIONES	175
VIII.	ANEXO	181
	• Resultados suplementarios	181
IX.	BIBLIOGRAFÍA	191

ÍNDICE DE FIGURAS

I.	Introducción	
	• Figura 1. Características clínicas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth	46
	• Figura 2. Genes conocidos asociados con CMT y desórdenes relacionados, así como su mecanismo patológico propuesto	47
	• Figura 3. Modelo de las posibles topologías de GDAP1 en la membrana	51
	• Figura 4. Estructura de la proteína GDAP1	53
	• Figura 5. Modelo propuesto para el papel de la mitocondria en la regulación del SOCE	60
	• Figura 6. Modelo propuesto para el papel de GDAP1 en la regulación del SOCE	62
	• Figura 7. Modelo del poro de transición mitocondrial comparando la configuración clásica frente al nuevo modelo	64
II.	Materiales y métodos	
	• Figura 1. Equipo para <i>plantar test</i>	79
	• Figura 2. Equipo para test de von Frey	80
	• Figura 3. Detalles del equipo para test de von Frey	80
	• Figura 4. Equipo para test rota-rod	81
	• Figura 5. Preparación <i>skin nerve</i>	83
	• Figura 6. Registro de la actividad eléctrica	85
	• Figura 7. Reacción enzimática de la glutamato deshidrogenasa empleada para la medida de liberación de glutamato en neuronas DRGs	90

III. Resultados

- **Figura 1.** Los ratones *Gdap1*-KO muestran menor sensibilidad nociceptiva térmica y mecánica, sin fallos motores significativos, en ensayos de comportamiento *in vivo* 102
- **Figura 2.** Los ratones *Gdap1*-KO no presentan alteraciones en las terminaciones nerviosas libres 105
- **Figura 3.** Los ratones *Gdap1*-KO muestran alteraciones electrofisiológicas en respuesta a estímulos sensitivos mecánicos 106
- **Figura 4.** Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO muestran alteraciones en la señalización nociceptiva por calcio y en la liberación de glutamato 108
- **Figura 5.** Las neuronas DRGs procedentes de ratones *Gdap1*-KO muestran una menor actividad SOCE 112
- **Figura 6.** Las neuronas cerebelares de ratones *Gdap1*-KO muestran una menor actividad SOCE 115
- **Figura 7.** Las neuronas DRGs procedentes de ratones *Gdap1*-KO muestran una menor actividad basal de los VGCCs 116
- **Figura 8.** Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas DRGs WT 119
- **Figura 9.** Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas cerebelares *Gdap1*-WT 121
- **Figura 10.** El tratamiento de neuronas WT con los inhibidores SOCE reproduce la reducción en la actividad del mecanismo que las neuronas *Gdap1*-KO presentan en condiciones basales 123
- **Figura 11.** La reducción en la activación del SOCE de las neuronas DRGs y cerebelares *Gdap1*-KO se asocia con menores niveles de calcio del retículo endoplásmico 125
- **Figura 12.** La reducción de actividad SOCE en neuronas DRGs *Gdap1*-KO es consecuencia de una menor entrada de calcio a través de la membrana plasmática, siendo el defecto especialmente relevante en las neuritas 126
- **Figura 13.** La reducción de actividad SOCE en neuronas cerebelares *Gdap1*-KO es consecuencia de una menor entrada de calcio a través de la membrana plasmática, siendo el defecto especialmente relevante en las

neuritas	127
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 14. Las neuronas DRGs <i>Gdap1</i>-KO muestran menor entrada de calcio a la mitocondria asociada a la menor activación del SOCE, siendo el defecto especialmente relevante en las neuritas 	128
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 15. Las neuronas cerebelares <i>Gdap1</i>-KO muestran menor entrada de calcio a la mitocondria asociada a la menor activación del SOCE, siendo el defecto especialmente relevante en las neuritas 	128
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 16. Las neuronas DRGs <i>Gdap1</i>-KO tienen menor potencial de membrana mitocondria basal y menor estimulación de la respiración mitocondrial en respuesta a agentes movilizadores de Ca^{2+} 	130
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 17. Los MEFs <i>SCaMC3</i>-KO tienen menor capacidad de retención de calcio 	134
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 18. Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i>-KO no muestran alteraciones en la respiración mitocondrial 	136
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 19. Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i>-KO no muestran alteraciones en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ basal ni en la morfología mitocondrial 	136
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 20. Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i>-KO son más susceptibles a la apertura del PTP 	138
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 21. Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i>-KO son más sensibles a alteraciones en los niveles de Ca^{2+} debido a agentes inductores del PTP 	139
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 22. Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i>-KO son más sensibles a agentes inductores del PTP 	140
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 23. Los MEFs procedentes de ratones <i>SCaMC3</i>-KO son más susceptibles a la muerte causada por agentes inductores del PTP 	142
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 24. Los MEFs procedentes de ratones <i>ADCK2</i>-HT no muestran alteraciones en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ basal ni en la morfología mitocondrial 	144
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 25. Los MEFs procedentes de ratones <i>ADCK2</i>-HT son más susceptibles a la apertura del PTP 	145
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 26. Los MEFs procedentes de ratones <i>Gdap1</i>-KO no muestran alteraciones en la respiración mitocondrial 	146
<ul style="list-style-type: none"> • Figura 27. Los MEFs procedentes de ratones <i>Gdap1</i>-KO son más susceptibles a la apertura del PTP 	147

• Figura 28. Los MEFs procedentes de ratones <i>Gdap1</i> -KO son más sensibles a agentes inductores del PTP	149
• Figura 29. Ensayos de comportamiento <i>in vivo</i> en ratones dobles <i>SCaMC-3 / Gdap1</i>	152
IV. Resultados suplementarios	
• Figura S1. Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas cerebelares <i>Gdap1</i> -KO	182
• Figura S2. Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas cerebelares <i>Gdap1</i> -WT	184
• Figura S3. Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas cerebelares <i>Gdap1</i> -KO	186

ÍNDICE DE TABLAS

I. Introducción	
• Tabla 1. Genes conocidos asociados con CMT y desórdenes relacionados	48
II. Materiales y métodos	
• Tabla 1. Genotipado para <i>Gdap1</i>	77
III. Resultados	
• Tabla 1. Farmacología de los canales CRAC	117

ÍNDICE DE ESQUEMAS

I. Resultados	
• Esquema 1. Regulación de los VGCC mediada por STIM1	114
• Esquema 2. La activación de PARP-1 promueve la disfunción mitocondrial	150

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

$\Delta\mu\text{H}^+$:	Fuerza protón motriz o gradiente electroquímico (proton motriz force or electrochemical gradient)
$\Delta\Psi_{\text{mit.}}$:	Potencial de membrana mitocondrial (mitochondrial membrane potential)
2-APB:	2-aminoetoxidifenil borato (2-aminoethoxydipenyl borate)
AD:	Enfermedad de Alzheimer (Alzheimer's disease)
AdN(s):	Adenín nucleótido(s) (adenine nucleotides)
AGC:	Transportador mitocondrial aspartato/glutamato (mitochondrial transporter aspartate/glutamate)
ANT:	Translocasa de nucleótidos de adenina (adenine nucleotide translocase)
Ant:	Antimicina A (antimycin A)
AP:	Potencial de acción (action potential)
Ara-C:	Citosina arabinosa (cytosine arabainoside)
BQ:	Bradiquinina (bradykinin)
CI-IV:	Complejos I-IV (complex I-IV), referidos a la cadena transportadora de electrones
$\text{Ca}^{2+}_{\text{cit.}}$:	Calcio citosólico (cytosolic calcium)
$\text{Ca}^{2+}_{\text{mit.}}$:	Calcio mitocondrial (mitochondrial calcium)
CaM:	Calmodulina (calmodulin)
(short-)CaMCs:	Transportadores mitocondriales dependientes de calcio (cortos) ((short) Ca^{2+} -dependent mitochondrial carriers)
CAP:	Capsaicina (capsaicin)
Cb:	Carbacol (carbachol)
CGRP:	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (calcitonin gene-related peptide)
CICR:	Liberación de calcio inducido por Ca^{2+} (calcium-induced Ca^{2+} release)
CMT:	Charcot-Marie-Tooth, referido a la enfermedad (Charcot-Marie-Tooth disease)
CoQ:	Coenzima Q (coenzyme Q), también referido simplemente como Q
CRAC:	Canales de entrada de Ca^{2+} activada por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channels)
CRC:	Capacidad de retención de Ca^{2+} (Ca^{2+} retention capacity), referida a la mitocondria
CsA:	Ciclosporina A (cyclosporine A)
CypD:	Ciclofilina D (cyclophilin D)
DIV:	Día <i>in vitro</i> (day <i>in vitro</i>)

DMEM:	Medio Eagle modificado de Dulbecco (Dulbecco's modified eagle's medium)
DMEM-F12:	Medio Eagle modificado de Dulbecco Ham's F12 (Dulbecco's modified eagle's médium Ham's Nutrient Mixture F-12)
DNP:	2,4-dinitrofenol (2,4-dinitrophenol)
DRG(s):	Ganglio(s) de raíz dorsal, referido a neuronas (dorsal root ganglion(s))
ETC:	Cadena transportadora de electrones (electron transport chain)
FCCP:	4-carbonil-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazine)
FNE:	Terminaciones nerviosas libres (free nerve endings)
GDAP1:	Proteína 1 asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos (ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1)
HCSS:	Solución salina-HEPES (HEPES-buffered control solution)
I_{CRAC} :	Corriente CRAC o de entrada de Ca^{2+} activada por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} current)
I_{SOC} :	Corriente SOC o corriente no selectiva de Ca^{2+} operada por depósito (store-operated current)
IMM:	Membrana mitocondrial interna (inner mitochondrial membrane)
IMS:	Espacio intermembranas (intermembrane space)
JPH1:	Juntofilina-1 (juntophilin-1)
MAM:	Membranas asociadas con la mitocondria (mitochondrial-associated membranes)
MAS:	Lanzadera NADH malato-aspartato (NADH malate-aspartate shuttle)
MCFs:	Superfamilia de transportadores mitocondriales (mitochondrial carriers family)
MCU:	Uniportador de calcio mitocondrial (mitochondrial calcium uniporter)
MEFs:	Fibroblastos embrionarios de ratón (mouse embryonic fibroblasts)
MEM:	Medio esencial mínimo (minimal essential médium)
MFN2:	Mitofusina-2 (mitofusin-2)
MMC:	Mega canal mitocondrial (mitochondrial megachannel), referido al PTP
M_r :	Masa molecular relativa o peso molecular (relative molecular mass or molecular weight)
NCLX:	Intercambiador mitocondrial Na^+/Ca^{2+} (mitochondrial Na^+/Ca^{2+} exchanger)
NK-1:	Receptores de neuroquinina-1 (neurokinin-1 receptor)
NMH:	Neuropatía motora hereditaria (hereditary motor neuropathy)
NSH:	Neuropatía sensitiva hereditaria (hereditary sensory neuropathy)
OCR:	Razón de consumo de oxígeno (oxygen consumption rate)
OGC:	Transportador de 2-oxoglutarato (2-oxoglutarate carrier)

Olig:	Oligomicina (oligomycin)
OMM:	Membrana mitocondrial externa (outer mitochondrial membrane)
OXPHOS:	Fosforilación oxidativa (oxidative phosphorylation)
(m)PTP:	Poro de transición de permeabilidad (mitocondrial) ((mitochondrial) permeability transition pore)
RE:	Retículo endoplásmico
REL:	Electrodo de registro de la actividad eléctrica (electrical activity register electrode)
ROS:	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
Rot:	Rotenona (rotenone)
rRNA:	Ácido ribonucleico ribosómico (ribosomal ribonucleic acid)
SAL:	Sistema anterolateral, referido a la sensibilidad
SCaMCs:	Transportadores mitocondriales dependientes de calcio cortos (short Ca ²⁺ -dependent mitochondrial carriers)
SEL:	Electrodo de estimulación eléctrica (electric stimulation electrode)
SERCA:	Ca ²⁺ ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (sarcoendoplasmic reticulum Ca ²⁺ transport ATPase)
SIF:	Fluido intersticial sintético (synthetic interstitial fluid)
SLC25:	Familia de transportadores de solutos 25 (solute carrier family 25)
SLN:	Ligadura del nervio espinal (spinal nerve ligation)
SNC:	Sistema nervioso central
SNP:	Sistema nervioso periférico
SOCE:	Entrada de calcio operada por depósito (store-operated calcium entry)
SP:	Sustancia P (substance P)
STIM:	Molécula de interacción estromal (stromal interaction molecule)
STS:	Estaurosporina (staurosporin)
Tapsi:	Tapsigargina (thapsigargin)
TCA:	Ácido tricarboxílico (tricarboxylic acid), referido al ciclo de los ácidos tricarboxílicos, ciclo de los ácidos cítricos o ciclo de Krebs
TRP(s):	Receptor(es) de potencial transitorio (transient receptor potential (channels))
TRPV1:	Receptor de potencial transitorio vainilloide tipo 1 (transient receptor potential vanilloid-1)
UPR:	Respuesta de las proteínas mal plegadas (unfolded protein response)
VC:	Velocidad de conducción, referida a las fibras nerviosas
VGCC:	Canales de calcio dependientes de voltaje (voltage-gated Ca ²⁺ channels)
VDAC:	Canal aniónico dependiente de voltaje (voltage-dependent anion channel)

INTRODUCCIÓN

1. ENFERMEDADES RARAS Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

Las denominadas enfermedades raras son enfermedades que afectan a un pequeño número de personas respecto a la población general y que, por su rareza, plantean cuestiones específicas. En Europa, una enfermedad es considerada rara cuando afecta a 1 de cada 2000 personas. Existen miles de enfermedades raras. A día de hoy, se han descubierto entre seis y siete mil enfermedades raras y continuamente se describen nuevas enfermedades en la literatura médica. Para la mayoría ellas no existe cura, pero el tratamiento apropiado y los cuidados médicos pueden mejorar la calidad de vida de los afectados y alargar su esperanza de vida. En este sentido un diagnóstico precoz suele ser clave y, de hecho, cientos de enfermedades raras pueden ahora diagnosticarse más fácilmente gracias a test que se realizan a partir de muestras biológicas (Fuente *Orphanet*, <http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/index.php>).

Dentro de las enfermedades raras, las enfermedades mitocondriales son un conjunto de desórdenes genéticos humanos que afectan a menos de 1 de cada 5000 nacidos vivos. Tradicionalmente, las enfermedades mitocondriales se refieren a desórdenes hereditarios que se caracterizan por una disfunción en la fosforilación oxidativa mitocondrial (OXPHOS), principal fuente de energía celular en forma de adenosina 5'-trifosfato (ATP). En general, se pueden clasificar como enfermedades mitocondriales primarias, como LHON, MERRF, etc., que son aquellas causadas por mutaciones en genes codificantes de proteínas de OXPHOS, tanto codificados por el DNA mitocondrial como nuclear. Y enfermedades en las cuales aparecen defectos en la función mitocondrial que son secundarios a otra causa, y que pueden ocurrir tanto en enfermedades muy prevalentes como Alzheimer, Parkinson, o cáncer, como en otras enfermedades raras como las distrofias musculares. Esto se debe al papel esencial que juega la mitocondria, no sólo en la producción de energía, sino también en la producción de ROS, en la homeostasis del calcio, y en la supervivencia celular por regulación de la apoptosis.

Los síntomas clásicos de una enfermedad mitocondrial incluyen neuropatías, epilepsia, oftalmoplejía externa, miopatía, episodios stroke-like (y leucoaraiosis extensiva), ataxia, y atrofia óptica y retinopatía pigmentaria. Los órganos más dependientes de energía del cuerpo, como el cerebro, el corazón, o los músculos esqueléticos y el páncreas endocrino, son los que normalmente se ven afectados por las enfermedades mitocondriales, puesto que son más vulnerables a fallos en la producción oxidativa de ATP. Respecto a las neuropatías, además de al SNC las enfermedades mitocondriales pueden también afectar a los nervios periféricos. La

enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT), en particular las formas axonales, pero también las formas desmielinizantes y las intermedias, ha sido descrita como una enfermedad mitocondrial (Martikainen and Chinnery, 2015).

1.1 Enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT)

La enfermedad Charcot-Marie-Tooth fue descrita por primera vez en 1886 por Charcot y Marie en París, y por Tooth en Londres, como una “atrofia peroneal muscular” (Charcot and Marie, 1886, Tooth, 1886). Es parte de un grupo de neuropatías hereditarias motoras y sensoriales clínica y genéticamente heterogéneo con una prevalencia de 1/2500 personas, siendo la neuropatía hereditaria más frecuente y uno de los desórdenes neurogenéticos más frecuentes (Skre, 1974, Martyn and Hughes, 1997).

Las principales características clínicas de este desorden son: aparición típicamente en la infancia, incidencia familiar, debilidad de lenta progresión, y atrofia muscular que afecta a los pies y piernas; posteriormente, las manos se ven también afectadas. Otras características clínicas pueden incluir depresión de los reflejos tendinosos y disfunciones sensoriales distales leves a moderadas (Martyn and Hughes, 1997, Skre, 1974, Charcot and Marie, 1886) (Fig. 1).

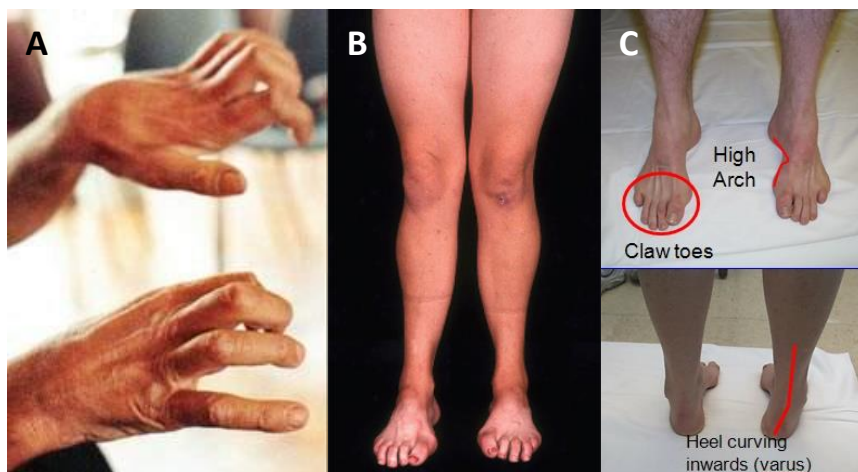
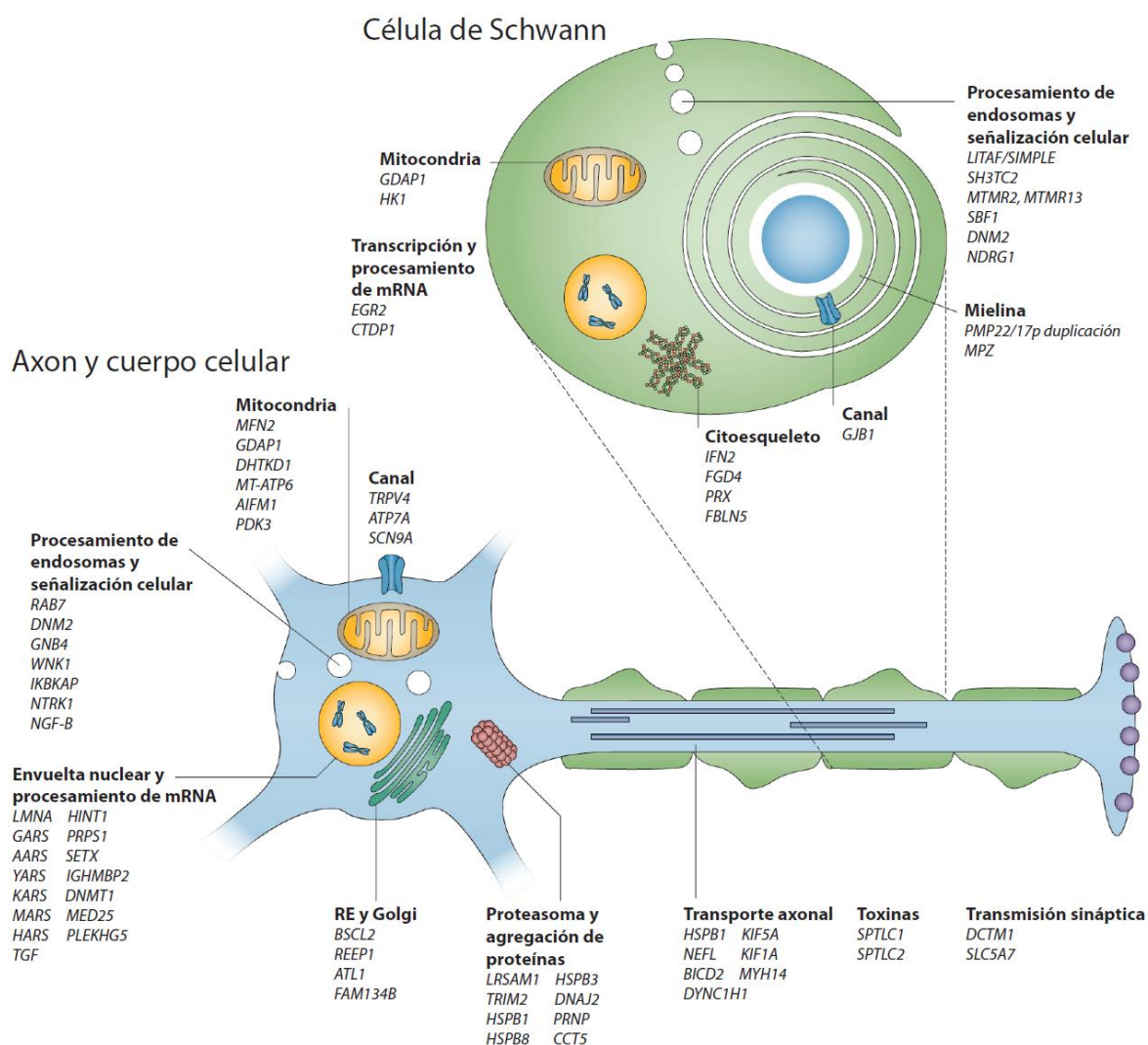


Figura 1. Características clínicas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth. Imágenes de algunos de los signos típicos del trastorno: manos en forma de garra (A), parte inferior de las piernas en forma de “patas e cigüeña” o “botella de champán invertida” (B), elevado arco del pie (pie cavo o varo) y dedos de martillo (C), respectivamente.

De manera general, la enfermedad de CMT se clasifica según la velocidad de conducción (VC) de nervios motores en diferentes tipos: CMT tipo 1 (CMT1) con VC < 38 m/s, CMT tipo 2 (CMT2) con VC > 38 m/s, y CMT intermedio (CMT3) con VC = 25-45 m/s (Dyck and Lambert, 1968, Davis et al., 1978, Harding and Thomas, 1980). Cada tipo de CMT presenta a su vez diferentes subtipos según el patrón de herencia genética: autosómica dominante, autosómica recesiva o ligada al cromosoma X. Por lo que otras clasificaciones distinguen 4 tipos diferentes (CMT1-4) más uno ligado al cromosoma X (CMTX). CMT1 se define como enfermedad desmielinizante, mientras que CMT2 es principalmente una disfunción axonal. Sin embargo, las formas axonales se pueden también subdividir en aquellas que son predominantemente motoras (clasificadas como neuropatías motoras hereditarias), las que son predominantemente sensoriales (neuropatías hereditarias sensoriales), y las que implican formas mixtas motoras y sensoriales. CMT3 produce una neuropatía desmielinizante infantil especialmente severa, CMT4 representa varios subtipos de neuropatías motoras y sensitivas desmielinizantes autosómicas recesivas, y CMTX está causada por una mutación puntual en el gen conexina-32 localizado en el cromosoma X (Liu and Wu, 2017).



(página anterior) **Figura 2. Genes conocidos asociados con CMT y desórdenes relacionados, así como su mecanismo patológico propuesto.** Abreviaturas: CMT, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; RE, retículo endoplásmico. Modificado de Rossor, Polke *et al.*, *Nat. Rev. Neurol.* (2013).

El estudio de la genética de CMT comenzó en 1991 con el descubrimiento de una duplicación en el brazo corto del cromosoma 17, que contiene el gen de la proteína de la mielina periférica de 22 kDa (*PMP22*), la causa más común de CMT, clasificada como CMT1 (Raeymaekers *et al.*, 1991). Posteriormente, en 1993 se descubrieron mutaciones en *GJB1*, *PMP22* y *MPZ*. Estas mutaciones, además de la duplicación en el 17p resultaron ser responsables del 76% de todos los casos de CMT1 y del 42% de todos los casos de CMT en estudios posteriores (Rossor *et al.*, 2013) (Fig. 2).

Una vez que el proyecto genoma humano se completó, el descubrimiento de genes CMT aumentó significativamente; tras la publicación del genoma humano completo en 2003, se identificaron 22 genes causantes de CMT (Fig. 4). A pesar de ello, sólo se han descrito nueve genes más asociados a CMT desde 2005 a 2009. En los últimos años sin embargo, esto ha cambiado drásticamente y a día de hoy se han descrito 70 genes asociados a CMT y otros desórdenes relacionados, 33 (47%) de los cuales se descubrieron después de 2009 (Fig. 2 y Tabla 1).

Tipo (número OMIM)	Gen	Fenotipo
CMT1 autosómica recesiva		
cmt1a (118220)	17p dup. (<i>PMP22</i>)	CMT1 clásica
	<i>PMP22</i> (mutación puntual)	CMT1 clásica; DSD; CHN (raramente recesiva)
CMT1B (118200)	<i>MPZ</i>	CMT1; DSD; CHN; CMT2 (raramente recesiva)
CMT1C (601098)	<i>LITAF</i>	CMT1 clásica
CMT1D (607678)	<i>EGR2</i>	CMT1 clásica; DSD; CHN
CMT1F (607734)	<i>NEFL</i>	CMT2 pero puede presentar VCM lenta en el rango CMT1 (raramente recesiva)
CMT1 PLUS (61444)	<i>FBLN5</i>	Degeneración macular, cutis laxa, NMH; VCN lenta
CMT1 autosómica dominante		
CMT4A (214400)	<i>GDAP1</i>	CMT1 o CMT2, normalmente severa con aparición temprana También se ha descrito parálisis de las cuerdas vocales y del diafragma

CMT4B1 (601382)	<i>MTMR2</i>	CMT1 severa; facial; bulbar; con focos de mielina plegada
CMT4B2 (604563)	<i>MTMR13</i>	CMT1 severa; glaucoma; con focos de mielina plegada
CMT4B3	<i>SBF1</i>	CMT1 severa; con focos de mielina plegada
CMT4C	<i>SH3TC2</i>	CMT1 severa; escoliosis; inclusiones citoplasmáticas
CMT4D O HMSNL (601455)	<i>NDRG1</i>	CMT1 severa; gitanos; sordera; atrofia de la lengua
CMTE (605253)	<i>EGR2</i>	CMT1; DSD; fenotipo CHN
CMTF (614895)	<i>PRX</i>	CMT1; predominantemente sensitiva; con focos de mielina plegada
GMT4G O HMSN RUSSE (605285)	<i>HK1</i>	CMT1 severa de aparición temprana; gitanos
CMT4H (609311)	<i>FGD4</i> (Frabin)	CMT1 clásica
CMT4J (611228)	<i>FIG4</i>	CMT1; predominantemente motora; progresiva
CCFDN (604168)	<i>CTDP1</i>	CMT1; gitanos; cataratas; características dismórficas
CMT2 autosómica dominante		
CMT2A (609260)	<i>MFN2</i>	CMT2; progresiva; atrofia óptica (raramente recesiva)
CMT2B O HSN1B (600882)	<i>RAB7</i>	CMT2 con complicaciones sensitivas (úlceras mutilantes)
cmt2c (606071)	<i>TRPV4</i>	CMT2; parálisis de las cuerdas vocales
cmt2D (601472)	<i>GARS</i>	CMT2 con debilidad predominantemente de la mano
cmt2e (607684)	<i>NEFL</i>	CMT2 pero puede presentar VCN en el rango de CMT1 (raramente recesiva)
cmt2f (606595)	<i>HSPB1</i>	CMT2 predominantemente motora
cmt2i (607677)	<i>MPZ</i>	CMT2 de aparición tardía
cmt2J (607736)	<i>MPZ</i>	CMT2 con pérdida auditiva y anormalidades pupilares
cmt2k (607831)	<i>GDAP1</i>	CMT2 de aparición tardía (dominante); CMT2 severa (recesiva)
cmt2l (608673)	<i>HSPB8</i>	CMT2 predominantemente motora
cmt2m O cmt2n (606482)	<i>DNM2</i>	CMT intermedia o CMT2; cataratas; oftalmoplejia; ptosis
cmt2N (613287)	<i>AARS</i>	CMT2 clásica
cmt2P (614436)	<i>LRSAM1</i>	CMT2 predominantemente sensitiva leve (dominante o recesiva)

cmt2q (615025)	<i>DHTKD1</i>	CMT2
hmsnp (604484)	<i>TFG</i>	CMT2 con implicación proximal
cmt2	<i>MARS</i>	CMT2 de aparición tardía
cmt2	<i>HARS</i>	CMT2
spg10 (604187)	<i>KIF5A</i>	CMT2; paraplejia espástica hereditaria
cmt2	<i>MT-ATP6</i>	CMT2; signos piramidales; recaídas
CMT2 autosómica recesiva		
cmt2b1 (605588)	<i>LMNA</i>	CMT2 de progresión rápida
cmt2b2 (605589)	<i>MED25</i>	CMT2 clásica
nman (137200)	<i>HINT1</i>	Neuromiotonía y neuropatía axonal; predominantemente motora
ar-cmt2	<i>TRIM2</i>	CMT2 de aparición infantil
CMT2 ligada al cromosoma X		
cmtx1 (302800)	<i>GJB1</i>	CMT1 masculina (VCN irregular); CMT2 femenina
cmtx4 o SÍNDROME DE COWCHOCK (3104990)	<i>AIFM1</i>	CMT2; aparición infantil; retrasos del desarrollo; sordera; dificultades en el aprendizaje
cmtx5 (311070)	<i>PRPS1</i>	CMT2; sordera; atrofia óptica
cmtx6	<i>PDK3</i>	CMT2
CMT intermedia dominante		
CMTDIB O CMT2M (606482)	<i>DNM2</i>	CMT intermedia o CMT2; cataratas; oftalmoplejía; ptosis
CMTDIC (608323)	<i>YARS</i>	CMT intermedia
CMTDID (607791)	<i>MPZ</i>	CMT intermedia
CMTDIE (614455)	<i>IFN2</i>	CMT intermedia; glomeruloesclerosis focal segmentaria; insuficiencia renal terminal
CMTDIF (615185)	<i>GNB4</i>	CMT intermedia
CMT intermedia recesiva		
CMTRIA (608340)	<i>GDAP1</i>	CMT intermedia
CMTRIB (613641)	<i>KARS</i>	CMT intermedia; dificultades en el aprendizaje; schwannoma vestibular
RI-CMT	<i>PLEKHG5</i>	CMT intermedia; SMA

Tabla 1. Genes conocidos asociados con CMT y desórdenes relacionados. Abreviaturas: CHN, neuropatía congénita hipomielinizante; CMT, enfermedad de Charcot-Marie-Tooth; DSD, enfermedad Dejerine-Sottas; NMH, neuropatía motora hereditaria; VCM, velocidad de conducción motora; VCN, velocidad de conducción nerviosa. Modificado de Rossor, Polke *et al.*, *Nat. Rev. Neurol.* (2013).

La prevalencia de CMT varía según el tipo/subtipo además de entre diferentes países o poblaciones y regiones dentro de un país (Barreto et al., 2016). La mayoría de los estudios de prevalencia se han centrado en CMT general y el resto en CMT1, el tipo de la enfermedad más común (Mostacciuolo et al., 1991). Los estudios de prevalencia de CMT2 son raros. En concreto, en España son particularmente frecuentes las mutaciones en el gen *GDAP1* (Sivera et al., 2013).

1.1.1. Charcot-Marie-Tooth asociada a *GDAP1*

El gen *GDAP1* codifica para la proteína *ganglioside-induced differentiation-associated protein 1* (proteína 1 asociada a la diferenciación inducida por gangliósidos); mutaciones en *GDAP1* están asociadas a diferentes formas de CMT1, CMT2 y CMT intermedia (Zuchner et al., 2004, Baxter et al., 2002, Cuesta et al., 2002, Pareyson and Marchesi, 2009, Reilly et al., 2011).

GDAP1, localizada en la membrana mitocondrial externa (OMM), está codificada por un gen de 6 exones en el cromosoma 8q21.11 y contiene dos dominios glutatión S-transferasa que flanquean un loop alfa4-alfa5 importante para la interacción proteica, un dominio transmembrana y otro hidrofóbico ambos flanqueados por aminoácidos básicos (Fig. 3) (Baxter et al., 2002, Cuesta et al., 2002, Cassereau et al., 2011b, Wagner et al., 2009).

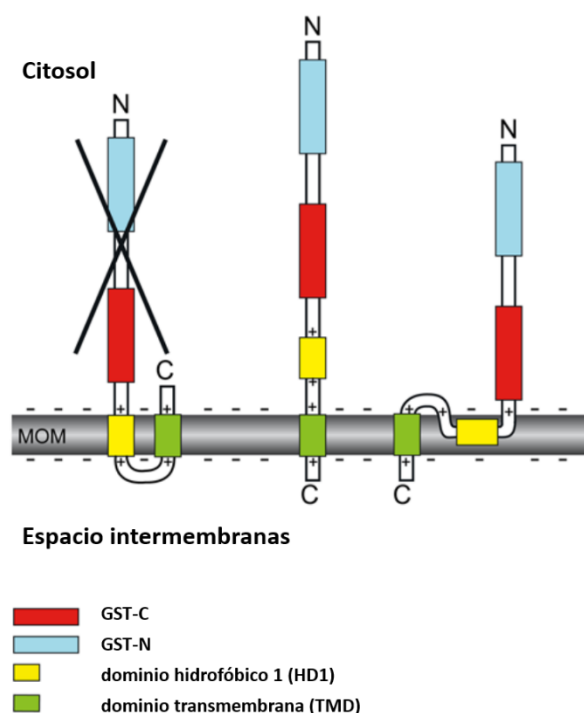


Figura 3. Modelo de las posibles topologías de GDAP1 en la membrana. Se ha confirmado experimentalmente un único dominio transmembrana con el extremo C-terminal en el espacio intermembranas y el extremo N-terminal

en el citosol. Con esta topología se han representado dos posibles disposiciones del HD1. Está tachada la topología que se ha descartado experimentalmente. MOM, membrana mitocondrial externa. Modificado de Wagner *et al.*, *Plos One* (2009).

Se cree que *GDAP1* participa en la dinámica mitocondrial regulando la fisión, proceso fundamental en la regulación de la forma, tamaño y número de mitocondrias, y en su transporte a lo largo de la célula (Detmer and Chan, 2007, Milone and Benarroch, 2012); sin embargo, el mecanismo exacto se desconoce. Tampoco se ha definido claramente si la proteína se localiza exclusivamente en los axones o si también se expresa en células de Schwann (Detmer and Chan, 2007, Milone and Benarroch, 2012, Niemann *et al.*, 2009, Cuesta *et al.*, 2002, Pedrola *et al.*, 2008).

Las mutaciones en *GDAP1* están asociadas a casos severos de CMT, de aparición temprana y de herencia normalmente autosómica recesiva, pero también dominante: se han descrito formas recesivas axonales (AR-CMT2K) (Cuesta *et al.*, 2002), recesivas desmielinizantes (CMT4A) (Baxter *et al.*, 2002), recesivas con características clínicas intermedias (CMTRIA) (Senderek *et al.*, 2003) y dominantes axonales (CMT2K) (Claramunt *et al.*, 2005, Sivera *et al.*, 2010). En general la neuropatía tiene una evolución severa, con aparición en la infancia y rápida progresión; los pacientes pierden completamente la movilidad distal, desarrollan debilidad proximal y quedan confinados a una silla de ruedas a la edad de 20-30 años (Cassereau *et al.*, 2011b, Moroni *et al.*, 2009, Sevilla *et al.*, 2008, Cassereau *et al.*, 2011a). La parálisis de las cuerdas vocales es frecuente y puede también darse implicación del diafragma (Sevilla *et al.*, 2008, Cassereau *et al.*, 2011b).

Las mutaciones recesivas, que son más severas, se encuentran en los exones 3 y 6, y tienden a involucrar preferentemente a los dominios GST o al loop alfa4-alfa5. Muchas son mutaciones de cambio de sentido, pero también se han descrito varias mutaciones de cambio de fase de lectura, mutaciones sin sentido y mutaciones en los sitios de corte y empalme, probablemente teniendo como resultado mutaciones de pérdida de función (Cassereau *et al.*, 2011b, Cassereau *et al.*, 2009). No existe una correlación clara entre genotipo y fenotipo, aunque las mutaciones recesivas que producen proteínas truncadas tienden a causar enfermedades más severas, lo que sugiere que la porción C-terminal es necesaria para la correcta localización de la proteína en la mitocondria y que tales mutaciones causan la completa pérdida de función. Las mutaciones de cambio de fase de lectura pueden resultar en una proteína que todavía está inserta en la membrana pero con función reducida o alterada, lo que tendría consecuencias menos severas

(Cassereau et al., 2009, Moroni et al., 2009) (Fig. 4). También se han descrito otras mutaciones de *GDAP1* que causan CMT2K autosómica dominante, una forma de CMT que tiene una aparición más tardía y un fenotipo menos severo que las formas recesivas (Cassereau et al., 2011a, Sivera et al., 2010, Zimon et al., 2011).

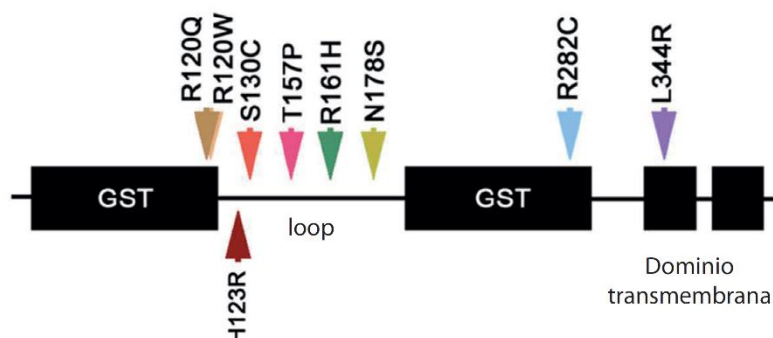


Figura 4. Estructura de la proteína GDAP1. Vista esquemática de la proteína y de algunas de las principales mutaciones de cambio de sentido. Modificado de Gonzalez-Sanchez *et al.*, *Sci. Rep.* (2017).

En cualquier caso el mecanismo patológico no está claro. Niemann y colaboradores mostraron que las mutaciones recesivas están asociadas con una actividad de fisión disminuida a través de un mecanismo de pérdida de función (Niemann et al., 2009). Una dinámica mitocondrial alterada podría conducir a un transporte mitocondrial alterado y a la degeneración axonal distal típica de CMT, aunque con diferente grado de severidad. De hecho, se ha demostrado que GDAP1 interacciona a través de su α -loop con proteínas del citoesqueleto, como β -tubulina, y con proteínas involucradas en el transporte de vesículas y mitocondrias, como RAB6B y caytaxina, y que esta interacción está alterada en las proteínas mutantes (Estela et al., 2011, Pla-Martin et al., 2013).

También se han descrito anomalías en la función mitocondrial (disminución de la actividad del Complejo I de la cadena respiratoria, producción excesiva de ROS, y disminución en la producción de ATP) en biopsias de músculo y piel obtenidas de pacientes con AD-CMT2K (Cassereau et al., 2011a).

1.1.2. Modelo murino de CMT asociada a *GDAP1*

El silenciamiento de *GDAP1* *in vitro* produce alteraciones en mecanismos de señalización por calcio junto con distribución anormal de la red mitocondrial (Pla-Martin et al., 2013). En moscas el aumento o la disminución en los niveles de GDAP1 reproduce las principales

características de degeneración neuromuscular de la enfermedad de CMT, y produciendo también alteraciones en la morfología y distribución mitocondrial en estadios tempranos, y alteraciones del estrés oxidativo y de la homeostasis del calcio en estadios más tardíos (Lopez Del Amo et al., 2015).

Actualmente existen dos modelos murinos de *Gdap1* knock out (*Gdap1*-KO). El modelo desarrollado por Niemann y colaboradores desarrolla una neuropatía periférica hipomielinizante relacionada con la edad, con alteraciones en el estrés oxidativo, mitocondrias intra-axonales más grandes y transporte mitocondrial alterado en las neuronas periféricas (Niemann et al., 2014). El modelo desarrollado por Barneo-Munoz y colaboradores, utilizado en este trabajo, desarrolla una neuropatía periférica con comportamiento motor alterado, con alteraciones electrofisiológicas y bioquímicas que indican una naturaleza axonal. También presenta pérdida progresiva de motoneuronas en el asta anterior de la médula espinal y defectos en las uniones neuromusculares. Las motoneuronas y las neuronas de ganglio de raíz dorsal obtenidas de los ratones *Gdap1*-KO muestran mitocondrias alargadas defectuosas, cambios en las cisternas del retículo endoplásmico (RE), acetilación reducida de la α -tubulina del citoesqueleto, aumento de las vesículas de autofagia, y menores niveles de calcio citosólico y de actividad del mecanismo conocido como entrada de calcio operada por depósito o SOCE (de sus siglas en inglés *store-operated calcium entry*) (Barneo-Munoz et al., 2015). Sin embargo, nada se ha investigado en ninguno de los modelos murinos *Gdap1*-KO sobre el posible fenotipo sensitivo característico de la patología humana de CMT.

2. MECANISMOS DE TRANSDUCCIÓN Y TRANSMISIÓN DEL DOLOR

Como se ha descrito en el apartado 1.1, una de las características típicas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth es la pérdida de sensibilidad. Sin embargo, dada la gran variabilidad clínica y que en la mayoría de los pacientes los síntomas motores son los que tienen un mayor impacto en la calidad de vida, existen poco estudios que evalúen específicamente la pérdida de sensibilidad asociada a la enfermedad (Ericson and Borg, 1999). La activación del sistema nociceptivo, una submodalidad del sistema somatosensorial, es especialmente importante debido a que la función fisiológica del dolor es advertir al organismo de la presencia de un

estímulo que puede producir una lesión desencadenando una señal de alarma que desencadenará los mecanismos necesarios para evitar o minimizar el daño.

La vía nociceptiva se inicia con la activación de nociceptores, que son terminaciones nerviosas libres sin especializar presentes en piel, músculos, articulaciones, ciertas vísceras, etc. y que son capaces de responder a estímulos mecánicos y térmicos de alto umbral (es decir, a intensidades potencialmente lesivas). Algunos de ellos responden, además, a mediadores de inflamación (como H^+ , histamina, etc.) Esta capacidad de respuesta se debe a la presencia de determinadas moléculas transductoras en sus terminales periféricos (Dubin and Patapoutian, 2010). Si bien se desconocen en gran medida los mecanismos moleculares de transducción, se han descrito numerosos canales iónicos que contribuyen a la detección, procesamiento y modulación de las señales nociceptivas (Bourinet et al., 2014). Entre estos destacan los canales permeables a Ca^{2+} , puesto que éste está implicado en procesos tales como la liberación de neurotransmisores (Neher and Sakaba, 2008), la activación de enzimas dependientes de calcio (Ghosh and Greenberg, 1995), y cambios en la expresión génica dependientes de calcio (Dolmetsch et al., 2001, Naranjo and Mellstrom, 2012, Wheeler et al., 2012). Por lo tanto, una señalización de calcio aberrante, como la que parece ocurrir en la enfermedad de CMT (Gonzalez-Sanchez et al., 2017, Pla-Martin et al., 2013), podría estar implicada en las alteraciones de las vías neuronales responsables de la modulación del dolor.

2.1 Ruta de la señalización nociceptiva

Las aferentes nociceptivas pueden clasificarse de muchas maneras, pero una de ellas es en función de su velocidad de conducción. También pueden clasificarse en función de la sensibilidad a diferentes tipos de estímulos. Las fibras $A\delta$, de pequeño diámetro y recubiertas de mielina, tienen una velocidad de conducción entre 1-5 m/s. Algunas responden a estímulos mecánicos, pudiendo o no responder a estímulos térmicos de alto umbral. Los nociceptores C son fibras amielínicas con velocidades de conducción <1 m/s; la mayoría de éstas son polimodales, es decir, responden a estímulos de distintas modalidades (mecánicos, térmicos o químicos) (Zimmermann et al., 2009).

Las aferencias primarias nociceptivas tienen su soma en los ganglios de la raíz dorsal (DRGs), y sus prolongaciones centrales llegan a las capas superficiales y laterales del asta dorsal de la médula espinal (láminas I y II las fibras $A\delta$, y láminas II y V las fibras C) donde realizan sinapsis con neuronas de segundo orden que pueden ser nociceptivo-específicas o de

amplio rango dinámico (estas últimas reciben, además, inputs de otras aferencias primarias no-nociceptivas). Los nociceptores usan como neurotransmisor el glutamato fundamentalmente, pero además, los denominados nociceptores peptidérgicos utilizan también neuropéptidos vasoactivos, como péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y sustancia P (SP) (Riera et al., 2014).

Tras un primer proceso integrador en la médula, las neuronas de proyección transmiten las señales nociceptivas a los subsiguientes centros de relevo encefálicos a través de diferentes tractos ascendentes, siendo el espinotalámico el predominante (~ 90 %). Esta vía está fundamentalmente relacionada con los aspectos discriminativos de la sensación de dolor: localización, intensidad y naturaleza del estímulo nocivo. Estas características dependen de la información transmitida desde el tálamo, donde la información nociceptiva es procesada en diferentes subnúcleos, hasta diferentes regiones de las cortezas somatosensoriales. Otra serie de vías ascendentes envían información desde la médula espinal a otras estructuras en el tronco del encéfalo, tálamo y corteza (amígdala, giro cingulado, formación reticular, sustancia gris periacueductal, ínsula....) donde se procesan los aspectos afectivo-emocionales del dolor (“Principios de neurociencia” de Haines, D. E. (Elsevier, 2ª edición, 2003)).

2.2 Señalización de Ca^{2+} en la aferencia primaria nociceptiva

La señalización mediada por Ca^{2+} en los nociceptores comienza con la entrada de este ion a través de diferentes moléculas transductoras. Los receptores mejor estudiados son los receptores TRP (o “receptores de potencial transitorio”). En mamíferos se han identificado 28 canales TRP que se clasifican en 7 subfamilias según su homología: TRPC (Clásicos o Canónicos), TRPV (Vainilloides), TRPM (Melastatina), TRPA (Homólogos de la proteína ANKTM), TRPP (Policistina), TRPLM (Mucolipina), TRPN (Homólogos de la proteína NOMP-C). En general, la estructura de los canales TRP consta de seis dominios transmembrana (S1-S6) con un lazo hidrófilo entre S5 y S6, que forma el poro iónico, y dos dominios intracelulares en los extremos *N*- y *C*-terminales. Normalmente un canal funcional se forma por la asociación de cuatro subunidades, pudiendo tratarse de homo- o hetero-oligómeros. Una serie de estos canales (como TRPV1, V3 y V4, TRPA1, TRPM3 y M8, TRPC1, C3 y C6) se expresan en nociceptores actuando como transductores sensoriales de temperaturas nocivas (tanto calor como frío), estímulos mecánicos de alto umbral y químicos. Estos estímulos van a provocar la apertura del canal permitiendo la entrada de Ca^{2+} y Na^{+} que provocará la despolarización de la membrana del receptor, de modo que al alcanzar el umbral, se dispararán potenciales de acción

que se transmitirán a la médula espinal. Pero estos canales también contribuyen a las variaciones en la concentración intracelular de Ca^{2+} , puesto que pueden provocar la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs) o provocar la liberación de Ca^{2+} desde el RE.

En los nociceptores, un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular tiene un gran impacto en su excitabilidad debido a efectos directos e indirectos sobre los mismos TRPs y otros canales iónicos. Estas señalizaciones mediadas por Ca^{2+} son fundamentales en los procesos de sensibilización periférica (Kaneko and Szallasi, 2014).

La identificación de la familia de receptores TRP ha sido de gran importancia en el estudio de la transmisión del dolor. Entre estos destaca el vainilloide tipo 1 (TRPV1), que actúa como receptor para el vainilloide capsaicina.

La capsaicina, es el ingrediente activo de las guindillas, y un clásico en el campo del dolor, puesto que un subgrupo de nociceptores se caracterizan precisamente por su sensibilidad a capsaicina, de ahí que su clonación en el año 1997 fuera un hito en el campo del dolor (Caterina et al., 1997). En aquel entonces, el canal era conocido como VR1 (receptor vainilloide tipo 1). Ahora se sabe que el receptor TRPV1 es un canal sensible al calor nociceptivo ($> 43^{\circ}\text{C}$), aunque también puede activarse con otro tipo de estímulos como protones ($\text{pH} < 5.2$), lípidos endógenos y ciertos mediadores de inflamación (Kaneko and Szallasi, 2014).

Además de expresarse en los nociceptores en el sistema nervioso periférico (SNP), TRPV1 se expresa también en la médula espinal, aunque parece que esa expresión está restringida a los terminales centrales de los nociceptores. Además, algunos autores describen la expresión de TRPV1 en neuronas de segundo orden y en otros tejidos no-neuronales (Brito et al., 2014, O'Neill et al., 2012). En cualquier caso, el papel de los receptores en médula espinal está aún poco claro.

Debido a su expresión específica en cierto tipo de nociceptores, el desarrollo de inhibidores de TRPV1, que muestran propiedades analgésicas, está recibiendo mucha atención en los últimos años. Por otra parte, si bien la activación de TRPV1 con capsaicina es capaz de producir sensibilización periférica y central, la administración prolongada o repetida de capsaicina de manera local en la epidermis resulta en la desensibilización del canal (Jancso et al., 1977, Szallasi and Blumberg, 1999). De hecho, la activación excesiva de TRPV1 produce citotoxicidad por Ca^{2+} provocando la muerte/destrucción de aquellos nociceptores positivos para TRPV1 (Karai et al., 2004, King et al., 2011, Szolcsanyi et al., 1990). Es precisamente en

esta propiedad en la que se basa la administración tópica de capsaicina como crema o parches tópicos (NGX-4010, Qutenza) para el tratamiento analgésico en ciertos tipos de dolor neuropático (Backonja et al., 2008, Jones et al., 2011, Simpson et al., 2008, Noto et al., 2009). Curiosamente, los antagonistas de TRPV1 han tenido menos éxito, debido al papel fundamental que este canal parece tener en la regulación de la temperatura corporal (Garami et al., 2011, Iida et al., 2005, Moran et al., 2011).

3. SOCE EN DEFICIENCIA EN GDAP1

La entrada capacitativa de Ca^{2+} se describió por primera vez hace cerca de 30 años (Putney, 1986, Takemura and Putney, 1989) en células inmunes como un mecanismo capaz de activar la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular después del vaciamiento de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares, principalmente el RE. La ruta se renombró posteriormente como entrada de calcio operada por depósito (SOCE) (Montero et al., 1993) y también como canales de entrada de Ca^{2+} activada por la liberación de Ca^{2+} de los depósitos intracelulares (canales CRAC, de sus siglas en inglés *Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} channels*, o I_{CRAC}) (Hoth and Penner, 1992) cuando se refiere a la corriente de Ca^{2+} medida en la membrana plasmática de células inmunes tras el vaciamiento de los depósitos intracelulares. El SOCE está presente en células excitables (Baba et al., 2003, Emptage et al., 2001, Skibinska-Kijek et al., 2009, Xia et al., 2014, Gemes et al., 2011, Narayanan et al., 2010, Berna-Erro et al., 2009, Selvaraj et al., 2009, Targos et al., 2005), donde coexiste con muchos tipos diferentes de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y operados por receptor en la membrana plasmática.

A pesar de la larga historia de los canales SOCE, el mecanismo molecular responsable de la entrada de Ca^{2+} se determinó hace sólo unos 10 años. El descubrimiento en 2005 y 2006 de algunos de los principales constituyentes de los canales CRAC, la familia de proteínas STIM como sensores de la concentración de Ca^{2+} del RE (Liou et al., 2005) y la familia de proteínas Orai como los canales de Ca^{2+} en la membrana plasmática (Feske et al., 2006), permitiendo así el estudio detallado del mecanismo SOCE y su función (Putney, 2009, Smyth et al., 2010, Lewis, 2011, Srikanth and Gwack, 2013, Cheng et al., 2013, Shaw et al., 2013).

La co-expresión de STIM1 y Orai1 genera corrientes de Ca^{2+} idénticas a las de I_{CRAC} nativo, operadas por depósito y con una muy alta selectividad por Ca^{2+} . Sin embargo, aunque I_{CRAC} es

ciertamente la corriente de Ca^{2+} mejor caracterizada responsable del SOCE, parece no ser la única. También se han descrito corrientes de Ca^{2+} operadas por depósito con propiedades diferentes (particularmente con selectividad por Ca^{2+} baja o no selectivas) que se han denominado I_{SOC} para diferenciarse de I_{CRAC} (Parekh and Putney, 2005). Los canales TRP, particularmente la subfamilia TRPC, también parecen ejercer una función importante en las corrientes I_{SOC} . Se ha descrito la participación de la mayoría de los miembros de la subfamilia TRPC para generar las corrientes de Ca^{2+} operadas por depósito y algunos autores mantienen que estas corrientes podrían estar generadas por combinaciones homo- o heteroméricas de diferentes subunidades de canales en los que participen TRPCs y/o Orai. La interacción entre estos canales homo/heteroméricos de la membrana plasmática con STIM1 en el RE podría conferirles propiedades operadas por depósito. De hecho se ha descrito que STIM1 interacciona físicamente tanto con Orai1 como con los canales TRPC (Dionisio et al., 2012, Albarran et al., 2014, Berna-Erro et al., 2012).

3.1 Homeostasis de calcio, mitocondria y SOCE

En la homeostasis de Ca^{2+} participan diferentes orgánulos celulares como el RE, la membrana plasmática, el núcleo y la mitocondria. El RE es el principal reservorio intracelular con una concentración de Ca^{2+} en estado de reposo de 500 μM , próximo a 1 mM, que es el nivel basal de Ca^{2+} en el espacio extracelular, muy por encima de la concentración de Ca^{2+} en el citoplasma y la mitocondria, que es de 100 nM (Szabadkai and Duchon, 2008).

La capacidad de la mitocondria de tamponar microdominios de alta concentración de Ca^{2+} también permite a la mitocondria modular la actividad de varios canales de Ca^{2+} que se ha visto muestran inactivación dependiente de Ca^{2+} . La función de la mitocondria en estos casos sería la de controlar la concentración local de estos microdominios de Ca^{2+} cercanos a la parte citosólica del canal. Los canales de entrada capacitativa de calcio fueron los primeros en los que se describió esta modulación por parte de la mitocondria (Hoth et al., 1997). La misma idea se empleó posteriormente para explicar la modulación por parte de la mitocondria de los canales VGCCs (Hernandez-Guijo et al., 2001, Tekmen and Gleason, 2010) y de los canales del RE de receptores IP_3 (Montero et al., 1997, Vay et al., 2007) (para ver una revisión más completa consultar Olson y colaboradores (Olson et al., 2012)).

La actividad de los canales SOCE se regula por la mitocondria, en el sentido de que se necesita una mitocondria funcional para evitar la inactivación del SOCE (Glitsch et al., 2002).

Esta regulación se basa en la habilidad de la mitocondria para reducir los niveles locales de Ca^{2+} de los microdominios cercanos a la parte interna del canal, evitando así la inactivación dependiente de Ca^{2+} (Fig. 5). Además la mitocondria también parece ejercer un efecto directo sobre la activación de la corriente CRAC. El tamponamiento del Ca^{2+} citosólico por la mitocondria parece competir con el rellenado de los depósitos por las bombas Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA), aumentando el vaciamiento del RE inducido por IP_3 , lo que a su vez conduce a una activación CRAC más rápida (Gilabert and Parekh, 2000). De este modo, el tamponamiento de Ca^{2+} por parte de la mitocondria es esencial tanto para activar como para mantener la actividad CRAC (Parekh, 2003) (Fig. 5).

En células inmunes muchos estudios sugieren que las mitocondrias realmente se mueven hacia los sitios de SOCE durante la activación celular (Joseph et al., 2014, Martin-Cofreces et al., 2014, Quintana et al., 2007, Quintana et al., 2011, Contento et al., 2010, Quintana and Hoth, 2012, Schwindling et al., 2010).

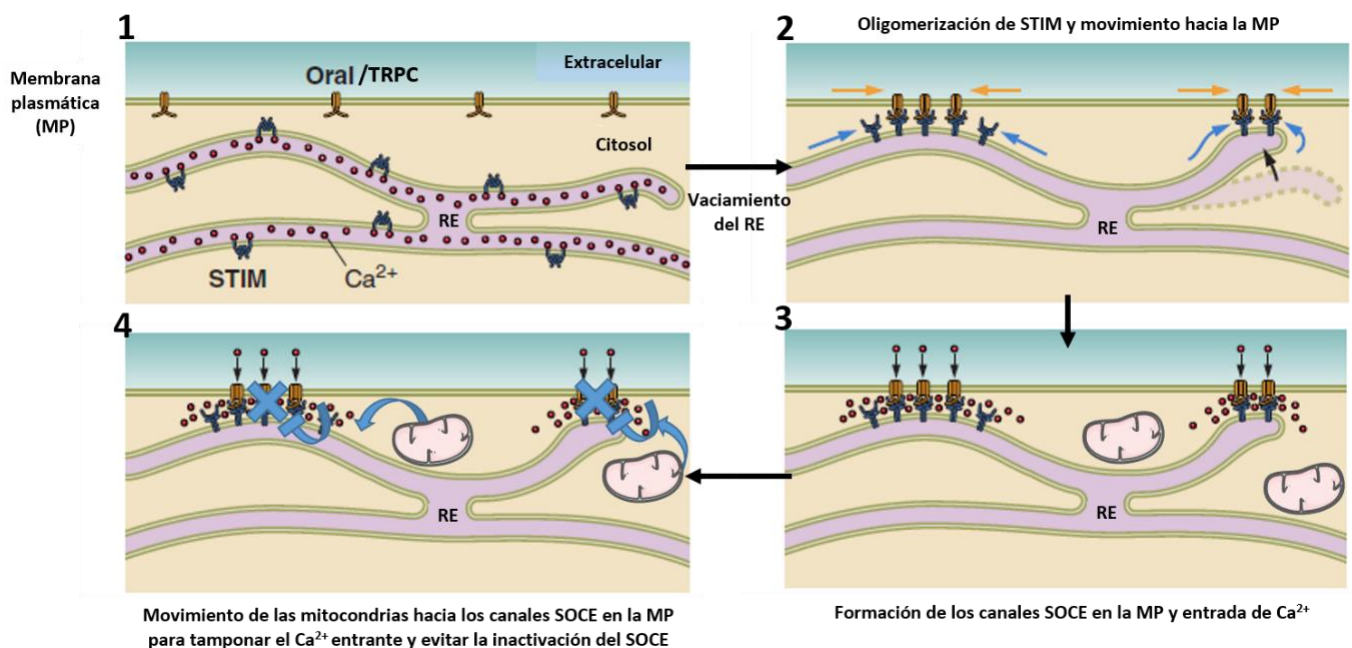


Figura 5. Modelo propuesto para el papel de la mitocondria en la regulación del SOCE. Eventos en el proceso de activación del mecanismo SOCE: (1) vaciamiento de Ca^{2+} del retículo endoplásmico (RE), (2) oligomerización de STIM en la membrana del RE y desplazamiento hacia regiones próximas a la membrana plasmática (MP), (3) interacción de STIM con las proteínas Orai y los TRPCs en la MP para formar el canal SOCE y permitir la entrada de Ca^{2+} desde el espacio extracelular, (4) movimiento de las mitocondrias hacia las regiones de la MP donde se han formado los canales SOCE para tamponar el Ca^{2+} entrante y evitar así la inactivación del canal SOCE. Modificado de Prakriya et al., *Physiol. Rev.* (2015).

Esto también sucede en la línea celular humana de neuroblastoma SH-SY5Y (Fig. 6) (Pla-Martin et al., 2013, Gonzalez-Sanchez et al., 2017). En otros tipos celulares no excitables, las evidencias de la regulación del SOCE por parte de la mitocondria son más débiles (Frieden et al., 2004, Giacomello et al., 2010, Contreras et al., 2010, Korzeniowski et al., 2009, Csordas et al., 2010, Shin and Muallem, 2010, Demaurex et al., 2009). De hecho, muchos estudios parecen indicar que en algunas condiciones el Ca^{2+} alcanza la mitocondria sólo después de pasar por el RE (Demaurex et al., 2009). Estos estudios indican que en estas células las mitocondrias sólo están expuestas al Ca^{2+} que se difunde secundariamente desde los sitios de entrada de Ca^{2+} SOCE, sugiriendo que la co-localización entre la membrana plasmática y el RE en los sitios de interacción STIM-Orai supone de hecho una barrera física para el acceso de las mitocondrias. Estos sitios de interacción STIM-Orai también se ha visto que co-localizan con las bombas SERCA en células no excitables (Alonso et al., 2012, Garcia-Sancho, 2014). En cuanto a neuronas, resultados obtenidos recientemente por Paloma González Sánchez indican que, a diferencia de neuroblastoma, la captura de calcio por la mitocondria no tiene influencia sobre el SOCE neuronal (Gonzalez-Sanchez, 2017).

3.2 GDAP1 y SOCE

El silenciamiento o mutaciones en *GDAP1* en células de neuroblastoma humano SH-SY5Y y disminuyen la entrada de Ca^{2+} a través del SOCE (Pla-Martin et al., 2013, Gonzalez-Sanchez et al., 2017). Esto mismo ocurre (disminución de la actividad SOCE) con la expresión de mutaciones recesivas de GDAP1 en la región del α -loop en sistemas heterólogos. El análisis de la distribución mitocondrial en células que expresaban estas mutaciones muestra fallos en el posicionamiento de la mitocondria cerca de la membrana plasmática en condiciones de activación del SOCE, lo que sugiere que ésta es la causa más probable de las alteraciones observadas en el SOCE. Por el contrario, mutaciones dominantes y mutaciones recesivas fuera del α -loop se comportan de manera distinta a la deficiencia en GDAP1. Por ejemplo, en las mutaciones dominantes en condiciones basales se produce un aumento de la localización mitocondrial cerca de la membrana plasmática, lo que puede explicar el aumento observado en estos casos en la actividad SOCE (Gonzalez-Sanchez et al., 2017) (Fig. 6).

Las motoneuronas de ratones *Gdap1*-KO tienen también una menor actividad SOCE (Barneo-Munoz et al., 2015), lo que sugiere que el defecto mitocondrial conferido por la falta de GDAP1 genera una disfunción del SOCE que en todos los casos se relaciona con una disminución en el contenido de Ca^{2+} del RE.

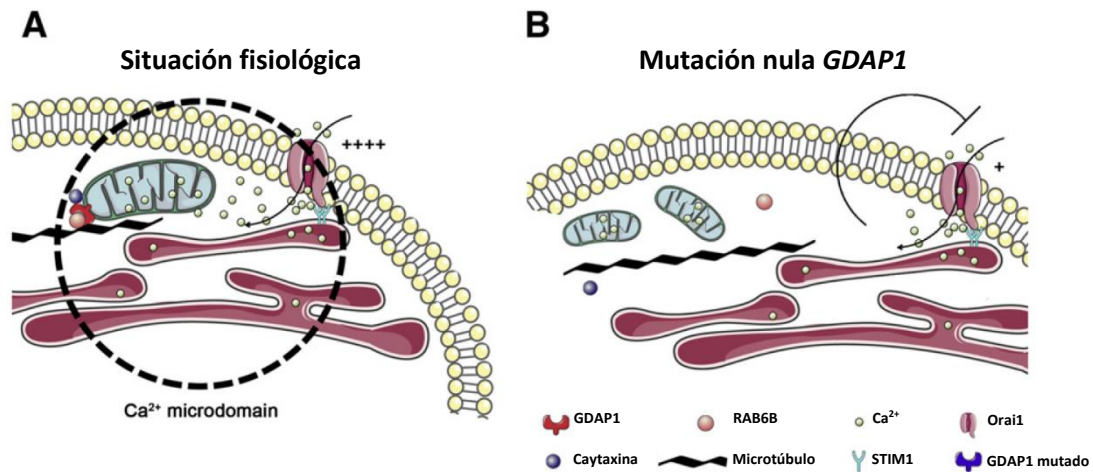


Figura 6. Modelo propuesto para el papel de GDAP1 en la regulación del SOCE. (A) El esquema muestra la participación de GDAP1 en el movimiento retrógrado y anterógrado mediado por RAB6B y caytaxina, respectivamente, lo que permite que la mitocondria se posicione en los microdominios de Ca^{2+} entre el RE y la membrana plasmática. (B) El movimiento mitocondrial puede verse afectado por la ausencia de GDAP1 en mutaciones nulas. En este caso la interacción de la mitocondria con la red de microtúbulos y su posicionamiento se modifican, lo que podría afectar a una correcta localización mitocondrial en los dominios subplasmalemales, afectando por lo tanto a la actividad del SOCE. Modificado de Pla-Martín *et al.*, *Neurobiol. Dis.* (2013).

4. EL CALCIO Y LA MITOCONDRIA

El calcio es un mensajero intracelular muy versátil, y la mitocondria ejerce un papel crucial en la homeostasis del Ca^{2+} . La capacidad de la mitocondria de tamponar grandes cantidades de Ca^{2+} de forma dependiente al voltaje se conoce desde hace décadas (Harris, 1977, Deluca and Engstrom, 1961, Nicholls, 1978). Su función, además de servir como sistema de tamponamiento de Ca^{2+} , es la de modular el metabolismo energético de la célula, al activar el ciclo de Krebs y OXPHOS (Gunter *et al.*, 2004, Balaban, 2009, Gonzalez-Sanchez *et al.*, 2017, Llorente-Folch *et al.*, 2013, Satrustegui and Bak, 2015). Las mitocondrias participan en procesos patológicos como la sobrecarga de Ca^{2+} (Duchen, 2000a, Duchen, 2000b).

La ruta clásica de entrada de Ca^{2+} a la mitocondria es a través del uniportador de calcio mitocondrial (MCU), identificado a nivel molecular como parte de un gran complejo denominado el complejo MCU (Baughman *et al.*, 2011, De Stefani *et al.*, 2011, Rizzuto *et al.*, 2012) que integra proteínas como: los moduladores de la sensibilidad a Ca^{2+} MICU1 y MICU2 (Perocchi *et al.*, 2010, Mallilankaraman *et al.*, 2012a, Patron *et al.*, 2014, Mallilankaraman *et al.*

al., 2012b), la subunidad dominante negativa MCUB (Raffaello et al., 2013), el regulador MCUR (Mallilankaraman et al., 2012a) y el regulador esencial de MCU, EMRE (Sancak et al., 2013). No obstante, también hay otras rutas que se piensa permiten la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria: se ha propuesto que Letm1 permite el intercambio $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$, como ruta de salida (Jiang et al., 2009, Jiang et al., 2013, Tsai et al., 2014), o como una ruta de entrada alternativa a MCU (Doonan et al., 2014). Otros autores consideran que Letm1 es un antiportador $\text{K}^{+}/\text{H}^{+}$ (Nowikovsky et al., 2004, Nowikovsky et al., 2012, Nowikovsky and Bernardi, 2014). Otros mecanismos todavía están siendo investigados, como las rutas de entrada responsables de la captura mitocondrial de Ca^{2+} en células deficientes en MCU (Pan et al., 2013).

Las rutas de salida también son esenciales para equilibrar los niveles citosólico y mitocondrial de Ca^{2+} : mientras que el intercambiador $\text{Na}^{+}/\text{Ca}^{2+}$ (NCLX) si ha sido caracterizado (Palty et al., 2010), el intercambiador $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ no se ha descrito todavía. Otra ruta de salida es la del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP), que se discutirá en profundidad en el siguiente apartado.

En conclusión, el equilibrio entre la entrada y la salida de Ca^{2+} a través de la membrana mitocondrial interna (IMM), así como el intercambio de Ca^{2+} con los depósitos intracelulares es lo que permite que se mantenga una regulación tan fina en la homeostasis del Ca^{2+} permitiendo así el correcto funcionamiento de múltiples procesos celulares. Para una revisión más extensa al respecto consultar los trabajos de Kann y colaboradores (Kann and Kovacs, 2007) y Fonteriz y colaboradores (Fonteriz et al., 2016).

4.1 El poro de transición de permeabilidad mitocondrial

El poro de transición de permeabilidad mitocondrial (mPTP) es un canal de alta conductancia cuya apertura conduce a un aumento en la permeabilidad de la IMM a solutos de masa molecular de hasta 1.5 kDa (Hunter and Haworth, 1979, Bernardi et al., 2006). El equivalente electrofisiológico se conoce como mega canal mitocondrial (MMC) (Zoratti et al., 2010, Petronilli et al., 1989). La transición de permeabilidad promueve la despolarización, hinchamiento de la matriz, vaciamiento de nucleótidos de piridinas, ruptura de la OMM y liberación de proteínas a la IMS, incluyendo citocromo c. La apertura del PTP tiene efectos deletéreos obvios para la conservación de la energía, al bloquear OXPHOS y la síntesis de ATP. Muchos factores regulan la apertura del PTP, algunos estimulándola (Ca^{2+} , Pi, especies reactivas de oxígeno (ROS), inhibidores de la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT), y

ácidos grasos) y otros inhibiéndola (Mg^{2+} , AdNs, Pi, inhibidores de la ciclofilina D (CypD) (como la ciclosporina A, CsA), y pHs ácidos) (Di Lisa and Bernardi, 2009, Bonora et al., 2013b). Se ha propuesto que la apertura del PTP participa no sólo en procesos patológicos cuando se produce la apertura irreversible bajo condiciones de sobrecarga de Ca^{2+} , sino también en procesos fisiológicos mediante una apertura transitoria que permite comunicar la matriz con el citosol para una señalización puntual y reversible (Wang et al., 2008).

Todavía no está clara la composición molecular el PTP. El modelo clásico comprende el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la OMM, ANT en la IMM, y CypD asociada a la matriz entre otros componentes (Zamzami et al., 2001, Kroemer et al., 2007). Más recientemente, diferentes grupos han mostrado que la ATP sintasa ejerce una importante función en el PTP, al silenciar la subunidad “c” (Bonora et al., 2013a, Alavian et al., 2014) o al formar dímeros que generan corrientes indistinguibles a las del MMC (Bernardi, 2013, Giorgio et al., 2013, Bonora and Pinton, 2014, Carraro et al., 2014). Estos descubrimientos sugieren que la ATP sintasa tiene una función dual, síntesis de ATP y formación del PTP, siendo el enzima clave para la síntesis de ATP a través de OXPHOS, y para la generación de mitocondrias despolarizadas y no funcionales para promover la muerte celular. En la figura 7 se muestra la configuración clásica del PTP (Fig. 7A) frente a la nueva composición molecular que se ha propuesto (Fig. 7B).

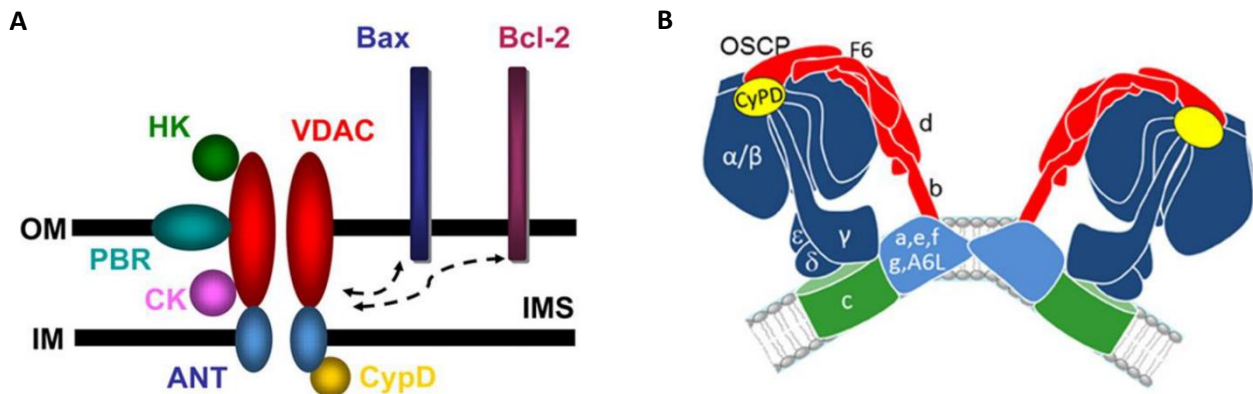


Figura 7. Modelo del poro de transición mitocondrial comparando la configuración clásica frente al nuevo modelo. (A) El modelo teórico muestra los componentes del PTP en la OMM y en la IMM: CK, creatina quinasa; Bax y Bcl-2, miembros de la familia Bcl-2 pro y antiapoptóticos; PBR, receptor periférico de benzodiazepinas; HK, hexoquinasa. Modificado de Kroemer *et al.*, *Physiol Rev.* (2007). (B) Nuevos descubrimientos sugieren que dímeros de la ATP sintasa podrían ser los responsables de la formación del PTP, y específicamente su anillo c (fragmento F_0). Abreviaturas: OSCP, proteína que confiere sensibilidad a oligomicina. Modificado de Bernardi P., *Front Physiol.* (2013).

Se ha descrito la implicación del PTP como inductor de la muerte celular en isquemia-reperfusión del corazón y cerebro (Pan et al., 2013, Nguyen et al., 2011), en muchas enfermedades neurodegenerativas (Rasola and Bernardi, 2011), como la enfermedad de Alzheimer (Du et al., 2009), de Parkinson (Thomas et al., 2012), o de Huntington (Perry et al., 2010). Sin embargo, su papel en la patofisiología de enfermedades menos prevalentes, como las enfermedades raras y las mitocondriales, ha sido menos estudiada, a pesar de que en éstas patologías se han descrito frecuentemente alteraciones en la producción de ROS que podrían favorecer la inducción del PTP (Iuso et al., 2006, Moran et al., 2010, Verkaart et al., 2007b, Verkaart et al., 2007a). De hecho, algunos estudios realizados en modelos celulares de EM muestran un incremento en la inducción del PTP que se ha asociado al déficit, primario o secundario de coenzima Q (Cotan et al., 2011, Rodriguez-Hernandez et al., 2009).

También se ha demostrado que la distrofia muscular por mutaciones en colágeno VI se debe a una disfunción mitocondrial latente (Bernardi and Bonaldo, 2013). El efecto es revertido por quelantes de Ca^{2+} y CsA y, puesto que la disminución farmacológica o genética de la formación del PTP reduce la degeneración del músculo, se propuso la implicación de una desregulación por Ca^{2+} y del PTP en la etiología de la enfermedad (Bernardi and Bonaldo, 2013, Rizzuto, 2003, Irwin et al., 2003).

Las aproximaciones terapéuticas basadas en la inhibición del PTP permiten mejorar la viabilidad celular con el objetivo de contribuir a la supervivencia de los tejidos afectados. Con frecuencia se utiliza *in vitro* la CsA aunque ésta presenta importantes efectos secundarios. Sin embargo, dosis moderadas de CsA se han usado con éxito en ensayos clínicos preliminares, abriendo la puerta al uso de derivados no inmunosupresores como Debio-025 (Bernardi and Bonaldo, 2013, Merlini et al., 2008, Merlini et al., 2011).

4.2 Metabolismo mitocondrial y calcio

El consumo de oxígeno está controlado en la mitocondria por la fuerza protón motriz o gradiente electroquímico ($\Delta\mu\text{H}^+$) (Mitchell, 2011, Mitchell and Moyle, 1967). En la mayoría de las células, el $\Delta\mu\text{H}^+$ se emplea principalmente para la síntesis de ATP. Al aumentar en las células la carga de trabajo o *workload* se produce el consumo de ATP y la producción de ADP y esto provoca el aumento de la producción de ATP por parte de la mitocondria, a través de la utilización del $\Delta\mu\text{H}^+$, estimulando la respiración.

En células excitables, el calcio regula la función celular a través de la activación tanto del consumo de ATP (contracción, movimiento, transporte de iones, bombas de Ca^{2+}) (ter Keurs, 2012, Carafoli, 1987), como de la producción de ATP mediante la estimulación de OXPHOS y otras vías (aumento del consumo de glicógeno) dependientes de calcio (Heilmeyer, 1991).

Aunque los cambios en la función mitocondrial en respuesta al aumento en la carga de trabajo se han descrito antes (Nicholls et al., 2003, Duchen, 1992), el control de la respiración por Ca^{2+} en neuronas intactas se ha descrito recientemente (Llorente-Folch et al., 2013).

La regulación de OXPHOS por parte del Ca^{2+} se produce a través de dos mecanismos: a) entrada de Ca^{2+} a la mitocondria a través de MCU, o b) la acción del Ca^{2+} en la cara externa de la IMM más que en la matriz. El Ca^{2+} activa varias enzimas del ciclo de Krebs: piruvato deshidrogenasa, α -cetoglutarato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa (McCormack et al., 1990), estimulando así la producción de ATP. Asimismo, el Ca^{2+} extramitocondrial regula el metabolismo de la mitocondria a través de la actividad de transportadores mitocondriales dependientes de Ca^{2+} ; los transportadores aspartato/glutamato de la lanzadera malato/aspartato y los transportadores $\text{ATP-Mg}^{2+}/\text{Pi}$ (Satrustegui et al., 2007, Amigo et al., 2013, Llorente-Folch et al., 2013). Estos transportadores mitocondriales se localizan en la IMM pero son capaces de detectar los niveles de Ca^{2+} citosólico a través de sus motivos mano EF situados en el espacio intermembranas (IMS).

OBJETIVOS

- I. Estudiar los cambios en la sensibilidad nociceptiva del ratón *Gdap1*-KO, modelo de Charcot-Marie-Tooth (CMT).
- II. Estudiar la(s) vías celulares implicada(s) y los posibles mecanismos de señalización implicados en la pérdida de sensibilidad nociceptiva hallada en el ratón *Gdap1*-KO.
- III. Estudiar la actividad SOCE, la homeostasis de calcio y la función mitocondrial en DRGs de ratones *Gdap1*-1 KO con el fin de elaborar una hipótesis patogénica de la enfermedad.
- IV. Poner a punto un sistema experimental que permita valorar en fibroblastos de pacientes y en MEFs la susceptibilidad a la apertura del PTP y validarlo en modelos celulares en los que se conoce que el PTP está alterado.
- V. Estudiar si el poro de transición de la permeabilidad (PTP) está alterado en la enfermedad de CMT causada por deficiencia en GDAP1, y si puede participar en vías de muerte celular.
- VI. Estudiar el efecto de la falta de SCA3 el transportador mitocondrial de ATP-Mg²⁺/Pi en la disfunción sensorial del ratón *Gdap1*-KO, como posible modulador de la disfunción, con vistas a definir la patogenia de la enfermedad.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. EXPERIMENTOS CON ANIMALES

1.1 Animales

Se utilizaron ratones control y ratones deficientes en *GDAP1* o en *SCaMC3*. Los animales se mantuvieron en el animalario con un ciclo de luz de doce horas y comida *ad libitum*. A la edad de interés, se sacrificaron por decapitación o por dislocación cervical para realizar los experimentos. Todos los experimentos con animales realizados en este trabajo se han llevado a cabo de acuerdo a la Directiva 2010/63/UE del Parlamento Europeo y con la aprobación del Comité Ético de la Universidad Autónoma de Madrid.

Los ratones *Gdap1-knock out* (*Gdap1*-KO) han sido generados por el laboratorio del Dr. Francesc Palau mediante delección del exón 1 de *Gdap1* por la estrategia de recombinación homóloga con un fondo genético mixto C57BL/6J:Sv129. Los animales nacen en proporciones Mendelianas y no muestran defectos fenotípicos evidentes. Su genotipado se realizó con modificaciones a partir de los protocolos descritos (Barneo-Munoz et al., 2015). Brevemente, se realizó una PCR con los ciclos indicados en la tabla 1. Se empleó la DNA polimerasa GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerasa (Promega, EEUU) y los primers directo (5'-GCCCTTGTTTCTCATCTACTCC-3'), reverso (5'-TGCAGGAAGGAACCCCTTCTC-3') y palo2 (5'-GTCTGCAGAGAGCAGGCCAACC-3'). Los productos resultantes se separaron por electroforesis en geles de agarosa 1.5% y se identificó el tamaño de los fragmentos.

Hot Start	8 min	95 °C
30 ciclos	30 segundos	95 °C
	30 segundos	60 °C
	1 minuto	72 °C
Final	8 minutos	72 °C

TABLA 1. Genotipado para *Gdap1*. Condiciones de la PCR.

Los ratones *SCaMC3-knock out* (*SCaMC3*-KO) han sido generados mediante la estrategia de recombinación homóloga por la empresa Lexicon Pharmaceuticals con un fondo genético mixto C57BL/6:Sv129. Los animales nacen en proporciones Mendelianas y no muestran

defectos fenotípicos evidentes. Su genotipado se realizó según los protocolos descritos (Amigo et al., 2013). Brevemente, se realizó una PCR doble utilizando los primers 9 (directo, 5'-TGAGGCATGAGGCATATTCTA-3') y 10 (reverso, 5'-AAGGCTGTGAAACATGAGCA-3') para detectar el alelo *wyld type*, y los primers Neo3a (directo, 5'-GCAGCGCATCGCCTTCTATC-3') y 12 (reverso, 5'-GGGCTAGCTGTATTACCAGTC-3') para detectar el locus diana.

Los ratones *SCaMC3/Gdap1* han sido generados en nuestro laboratorio mediante cruce entre las cepas *SCaMC3* y *Gdap1*. Los animales nacen en proporciones Mendelianas y no muestran defectos fenotípicos evidentes. Su genotipado se realizó según lo descrito anteriormente.

1.2 Tests de comportamiento

Para los experimentos con animales *Gdap1*, se utilizaron ratones *Gdap1* control (*Gdap1*-WT) y *Gdap1*-KO. Por un lado, se testaron grupos de hembras de 1 a 11 meses (entre 6 y 17 hembras por genotipo) y, por otro lado, grupos de machos de 2 a 11 meses (entre 5 y 12 machos por genotipo).

Para los experimentos con animales *SCaMC3/Gdap1*, se utilizaron cuatro grupos de animales: ratones *SCaMC3*-WT/*Gdap1*-WT, *SCaMC3*-KO/*Gdap1*-KO, *SCaMC3*-WT/*Gdap1*-KO, y *SCaMC3*-KO/*Gdap1*-WT. En este caso se testaron únicamente machos de 5 a 7 meses (entre 6 y 10 machos por genotipo).

Durante el tiempo que duraron los tests de comportamiento, los animales a testar se mantuvieron en jaulas independientes, agrupando sólo los ratones hermanos de camada, con un ciclo de luz de doce horas y comida *ad libitum*. Los experimentos se realizaron durante la fase de luz (de 9:00 a 17:00 h).

1.2.1 Test de Hargreaves (*Plantar Test*) (Sensibilidad nociceptiva térmica)

Se utilizó el test de Hargreaves o *plantar test* para evaluar la nocicepción térmica (Hargreaves et al., 1988). Los animales se colocan individualizados en habitáculos sobre una superficie de Plexiglas debajo de la cual se desplaza el dispositivo, que consiste en una lámpara infrarroja para la aplicación de calor, y un sensor capaz de detectar el movimiento en la pata del animal y medir el tiempo que el ratón tarda en responder y retirar la pata (latencia) (*Plantar Test*, Hargreaves Apparatus, Ugo Basile, Italia) (Figura 1).

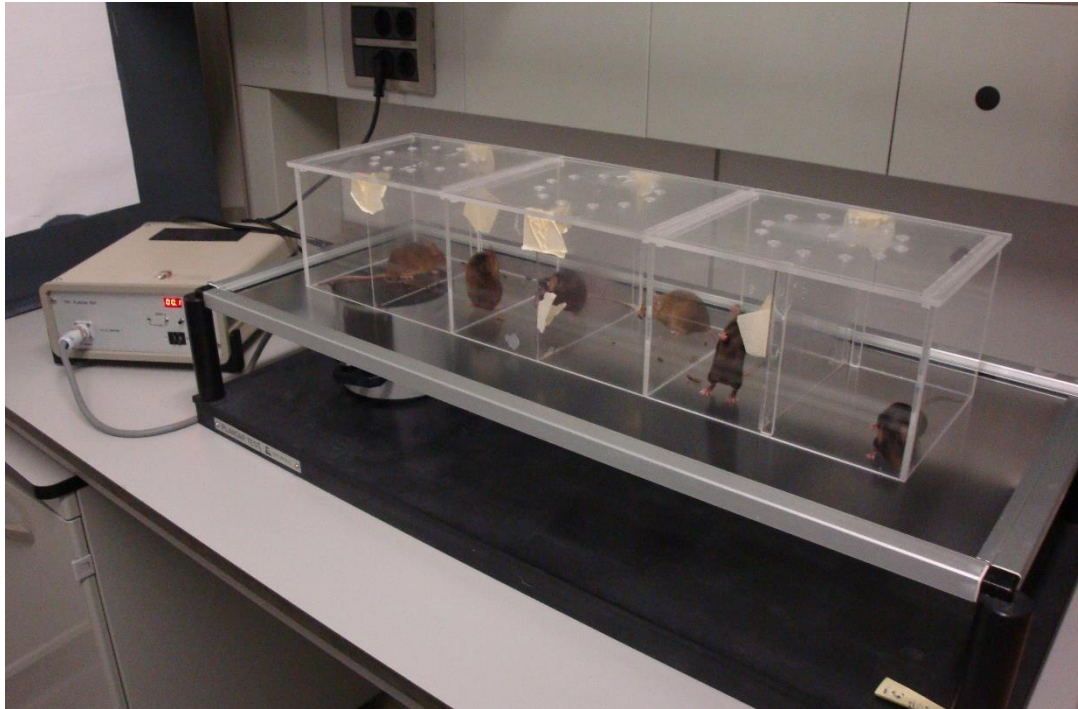


FIGURA 1. Equipo para *plantar test*. Obsérvese a los ratones individualizados en los 6 habitáculos sobre la mesa de Plexiglas bajo la que se desplaza la fuente infrarroja. A la izquierda de la foto se puede observar el dispositivo para regular la intensidad de la lámpara infrarroja con el indicador del tiempo de respuesta.

El día anterior a la realización del test los animales se mantuvieron en los habitáculos durante unos 15 minutos para su aclimatación. Se realizaron dos días consecutivos de ensayos, dos ensayos en la pata derecha y dos en la izquierda cada día. El estímulo térmico nocivo se aplicó en las patas traseras de los animales, considerando el ensayo como positivo cuando se observaba una clara retirada de la pata e incluso que tras haber aplicado el estímulo el animal posteriormente se lamía la pata. La nocicepción térmica se evalúa como la latencia medida en segundos.

1.2.2 Test de von Frey (Sensibilidad nociceptiva mecánica)

La sensibilidad nociceptiva mecánica se determina como el umbral en la cantidad de fuerza necesaria para causar una respuesta en el animal, como la retirada de la pata del estímulo aplicado (Chaplan et al., 1994). Este umbral de retirada de la pata (PWT, de sus siglas en inglés *paw withdrawal threshold*) se ha estimado utilizando filamentos von Frey (Aesthesio®, set de 20 monofilamentos von Frey, Ugo Basile, Italia) (Fig. 2 y Fig. 3) siguiendo el método *up-down* simplificado (SUDO, de sus siglas en inglés *simplified up-down method*) (Bonin et al., 2014).

Los animales se colocan individualizados en habitáculos sobre una mesa de rejilla a través de la cual se aplican los filamentos von Frey en las patas traseras del animal (Fig. 2). El día anterior a la realización del test los animales se mantuvieron en los habitáculos durante 1 hora para su aclimatación.

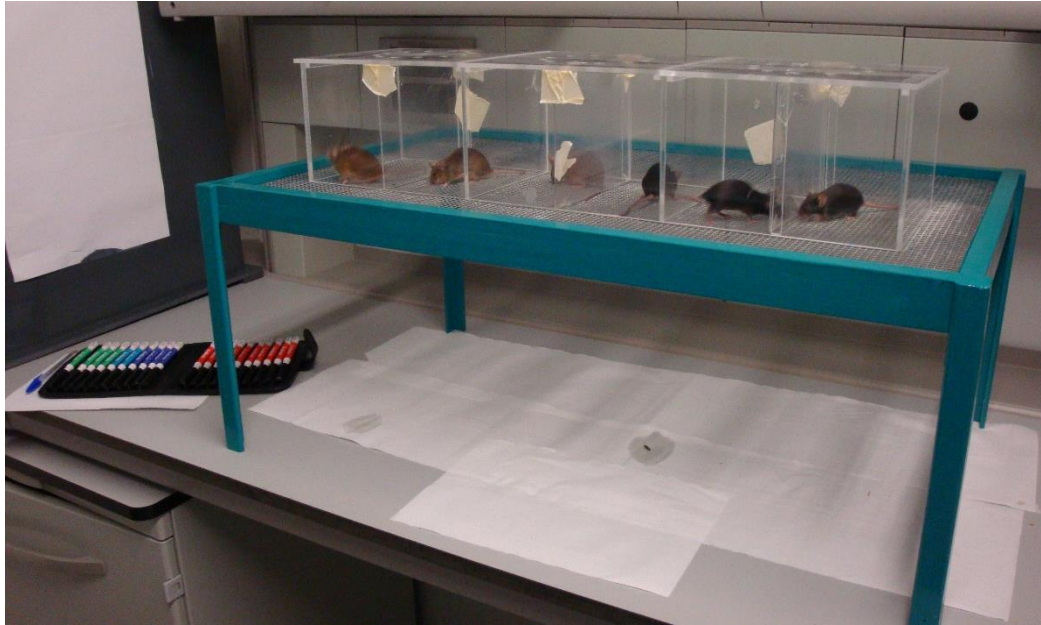


FIGURA 2. Equipo para test de von Frey. Obsérvese a los ratones individualizados en los 6 habitáculos sobre la mesa de rejilla a través de la cual se aplican los filamentos von Frey en las patas traseras de los animales. A la izquierda de la foto se puede observar el kit de filamentos de von Frey.

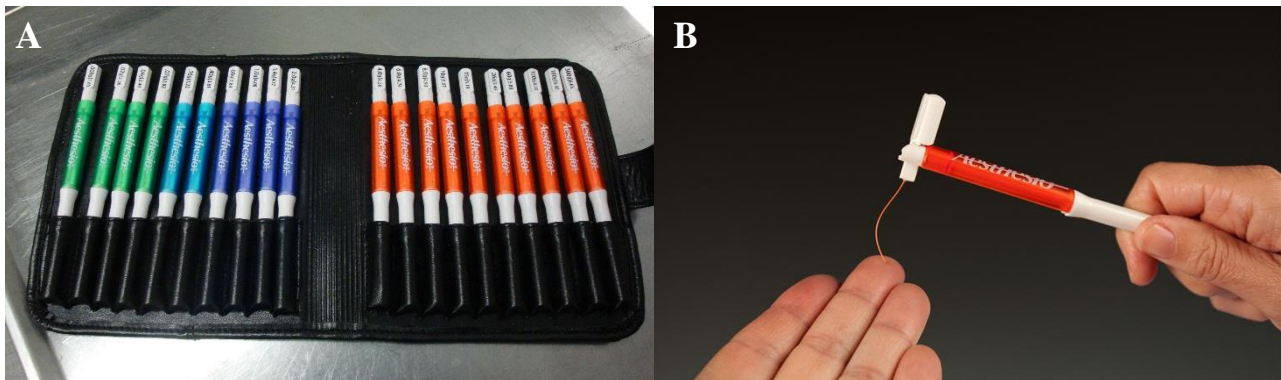


FIGURA 3. Detalles del equipo para test de von Frey. (A) Kit completo de filamentos de von Frey. (B) Véase en qué consiste el filamento de von Frey abierto y cómo se aplica.

Se realizan 5 ensayos en cada pata trasera del animal, comenzando por el filamento de fuerza intermedia (0.4 g) y pasando a un filamento de fuerza inferior o superior en función de si la

respuesta era positiva o negativa. Se consideró el ensayo como positivo cuando se observaba una clara retirada de la pata e incluso que tras haber aplicado el filamento el animal posteriormente se lamía la pata. La nocicepción mecánica o PWT se evalúa como el valor del último filamento von Frey aplicado añadiendo un factor de corrección de -0.5 si el ensayo fue positivo y +0.5 si fue negativo.

1.2.3 Test rota-rod (Comportamiento motor)

Se utilizó el test rota-rod para evaluar la coordinación motora (Dunham and Miya, 1957, Jones and Roberts, 1968). Los animales se colocan en el aparato rota-rod (Accelerating Mouse Rota-Rod, Ugo Basile, Italia) (Fig. 4) y se mide el tiempo que son capaces de mantenerse sobre el dispositivo (latencia).

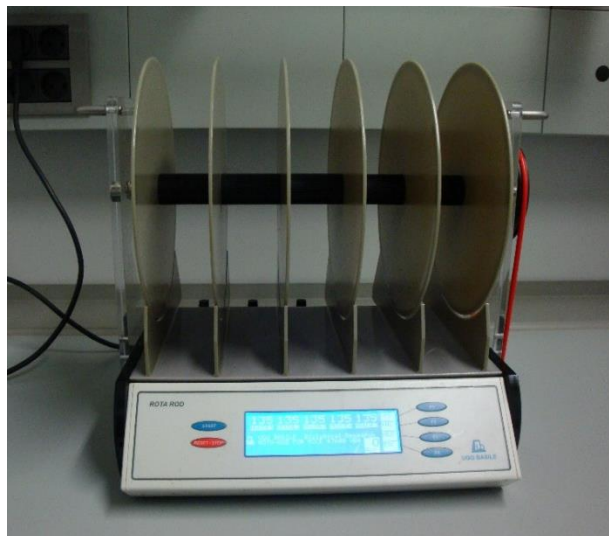


FIGURA 4. Equipo para test rota-rod. Obsérvense los carriles individualizados que permiten testar simultáneamente hasta 5 ratones y el cilindro sobre el que se colocan y que gira según los parámetros determinados por la consola inferior.

Dos días antes de realizar el test se realiza un primer entrenamiento que consiste en cuatro ensayos de 1 min a una velocidad constante de 4 rpm. El día anterior al test se realiza el segundo entrenamiento que consiste en cuatro ensayos de 2 min a una velocidad creciente desde 4 hasta 8 rpm (aceleración de 1.0).

Se realizaron dos días consecutivos de ensayos, cinco ensayos cada día, cada ensayo de máximo 5 min, a una velocidad creciente desde 4 hasta 40 rpm (aceleración de 4.4). Se registra

el tiempo al que el animal se cae del cilindro en movimiento o cuando da tres vueltas (con menos de 6 segundos entre cada vuelta) agarrado al cilindro.

1.3 Inmunohistoquímica para el análisis de las terminaciones nerviosas libres (FNE)

Los ratones control y *Gdap1*-KO de 6 meses de edad fueron sacrificados por dislocación cervical y rápidamente se realizaron biopsias de la piel plantar de las patas traseras izquierda y derecha (2 ratones por genotipo). Las biopsias se fijaron en fijador Zamboni durante 6 h a temperatura ambiente (RT, de sus siglas en inglés, *room temperature*). A continuación se lavaron 3 veces con PBS, crioprotegieron en 20% sacarosa (p/v en PBS) durante 24 h, se embebieron en Tissue-Tek® OCT™ (SakuraFinetek Europe, Holanda), y se realizaron secciones perpendiculares a la superficie plantar (orientación dermis-epidermis) de 40 µm mediante vibratomo (Leica, Alemania). El marcaje de las FNE se realizó según un protocolo modificado de Cabrera y colaboradores (Cabrera et al., 2015). Brevemente, las secciones se lavaron en PBS con 1% de Triton-X100 (PBS+TX). Para el marcaje de las FNE se usó el anticuerpo anti-protein gene product (PGP) 9.5 generado en conejo (1:500) (Cedarlane-Ultracel, Canadá) y la tinción de ácidos nucleicos To-Pro-3 (1:200) (ThermoFischer, EEUU). Como anticuerpo secundario se utilizó el anti-rabbit Alexa555 generado en burro (1:500) (ThermoFischer, EEUU). El análisis confocal se realizó en un microscopio de barrido láser confocal LSM510 acoplado a un microscopio invertido Axiovert200 M, utilizando un objetivo 40X/1.3 oil Plan-Neofluar (Zeiss, Alemania). Se tomaron planos consecutivos con una distancia de 0.75 µm entre planos y se realizó el montaje de los planos para poder visualizar completamente el recorrido de las FNEs. Finalmente, se realizó el análisis de las imágenes correspondientes de al menos 8-10 secciones (mínimo 28 campos/genotipo) utilizando el programa Zeiss LSM510 4.2 y el procesador de imágenes Fiji (NIH), comparando el número por sección y la distribución de las FNEs.

1.4 Estudios de electrofisiología en fibra única

1.4.1 Obtención y mantenimiento de la preparación *skin-nerve*

Los ratones control y *Gdap1*-KO de 3 meses de edad fueron sacrificados por dislocación cervical para obtener una preparación experimental de *skin-nerve* según el protocolo descrito

por Zimmerman y colaboradores (Zimmermann et al., 2009). Brevemente, se realizó la disección del nervio safeno junto con la piel que éste inerva que se corresponde con la situada en la zona dorsal de las patas traseras. La preparación se coloca en un baño de órganos con una base de Sylgard® (Dow Corning, EEUU) de modo que se fijaba por medio de unos pines metálicos con la parte del corium hacia arriba (Fig. 5). La preparación es perfundida continuamente con fluido intersticial sintético (SIF, composición en mmol/L: NaCl 108, KCl 3.48, MgSO₄ 0.7, NaHCO₃ 26, NaH₂PO₄ 1.7, CaCl₂ 1.53, gluconato de sodio 9.6, glucosa 5.55 y sacarosa 7.6) oxigenado con carbógeno a una velocidad de 5 mL/min. La temperatura del baño se mantiene a 32 ± 1 °C mediante un dispositivo Peltier (Warner Instruments, EEUU). La segunda preparación del mismo animal se mantuvo en SIF oxigenado a 4 °C para su uso posterior en el mismo día. No se detectaron diferencias significativas en los resultados de la primera y segunda preparación.

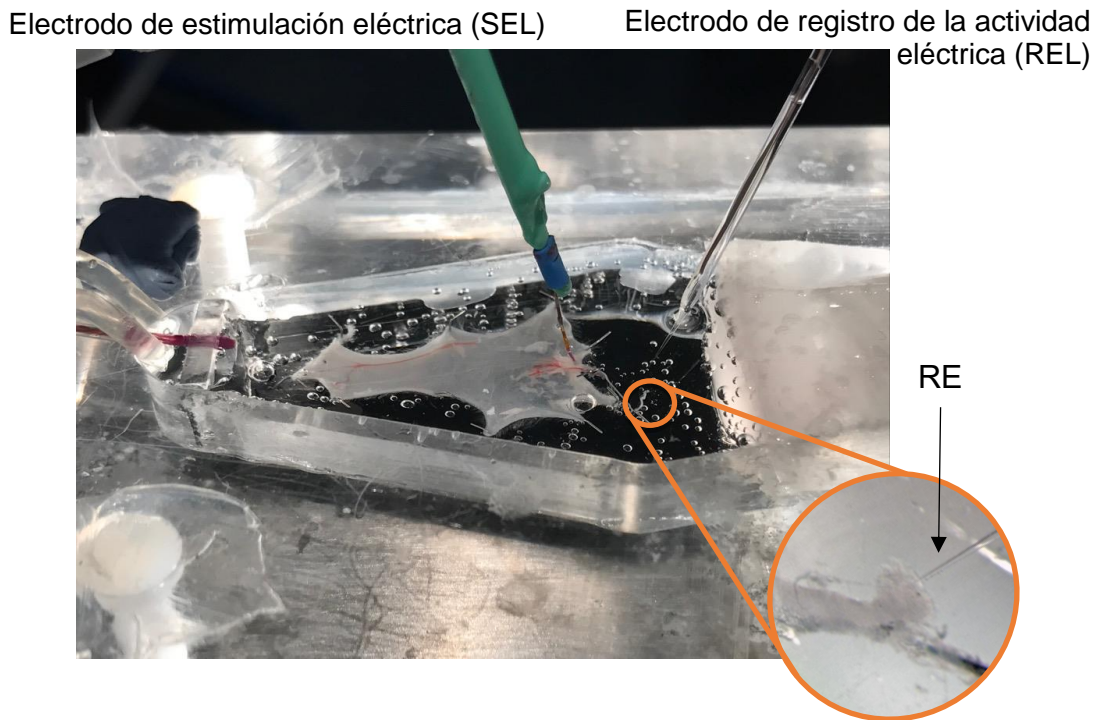


FIGURA 5. Preparación *skin nerve*. Cámara de registro en la que se coloca la preparación y sobre la que se perfunde el fluido SIF (parte izquierda). Obsérvese el electrodo de estimulación eléctrica (SEL) y el electrodo de registro de la actividad eléctrica (REL). En la ampliación, detalle del extremo proximal del nervio seccionado donde se coloca el RE.

1.4.2 Procedimientos electrofisiológicos

Para el registro de actividad, el extremo proximal del nervio se estudiaba mediante un microelectrodo de vidrio de succión según el protocolo descrito por Roza y colaboradores (Roza

and Lopez-Garcia, 2008). Los microelectrodos se obtienen de capilares de vidrio (de diámetro externo 1.2 mm, Harvard Apparatus, EEUU) que se estiraba horizontalmente por medio de una estiradora de microelectrodos (“microelectrode puller” Flaming/Brown Micropipette Puller-Model P97, Sutter Instruments, EEUU). Los electrodos se rellenaban de solución SIF y se insertaban en una semicélula acoplada a un preamplificador (amplificación 10x) colocado sobre un micromanipulador (Narishige, Japón), para aproximar de modo controlado y con ayuda de una lupa la punta del microelectrodo (diámetro final $\sim 20 - 30 \mu\text{m}$ con suavidad) al extremo proximal del nervio. El electrodo de referencia (o electrodo de tierra), formado por una pastilla de precipitado de cloruro de plata, se coloca en el propio baño.

Al aplicar presión negativa, algunas de las fibras del nervio se introducen en el electrodo de modo que éstas quedan aisladas eléctricamente, de este modo podemos establecer la presencia de fibras aplicando algún estímulo sobre la piel donde las fibras tienen sus campos receptores periféricos. Se realizó una exploración mecánica aplicando sobre la piel un bastón romo de vidrio para localizar el campo receptor y posteriormente se aplicaron sobre el campo receptor filamentos de von Frey calibrados para establecer el umbral mecánico de la fibra. Finalmente, se aplicaba en el campo receptor un estímulo eléctrico para conocer la velocidad de conducción (VC) de las fibras. Los estímulos se aplican mediante un electrodo bipolar de tungsteno (World Precision Instruments, EEUU), que está conectado a un generador de pulsos –MASTER 8 AMPI -a través de una unidad de aislamiento óptico (Fig. 6).

La señal generada en el preamplificador ($\times 10$ Dagan 4001) se envía a un amplificador, donde se amplifica y se filtra (filtro paso banda 300-1200 Hz, EX4-400 Quad Differential amplifier, Dangan Corporation, EEUU), desde el que la señal se distribuye a una serie de aparatos: un sistema de eliminación del ruido de 50 Hz (HumBug Quest Scientific, Canadá), un osciloscopio (Gould Classic 6100, Tru Trace) para visualizar la señal y a un convertidor analógico-digital (CED 1401, Cambridge Electronic Design, Reino Unido) que envía las señales a un PC para ser monitorizadas y grabadas con el programa de adquisición de señales bioeléctricas (Spike 2, versión 7.09 Cambridge Electronics Design Ltd, Reino Unido). Además, la señal se envía a un amplificador de audio (Neurolog System, Digitimer, Reino Unido) conectado con un altavoz.

Las fibras se clasificaron según su velocidad de conducción en fibras de tipo A ($VC > 1 \text{ m/s}$) o de tipo C ($VC < 0.8 \text{ m/s}$) de acuerdo a experimentos piloto de registro de nervio completo, que mostraron que la descarga de una fibra tipo C tiene una VC de 0.8 m/s. Además según su umbral mecánico, las fibras se dividieron en fibras mecánicas de alto umbral ($> 5.7 \text{ mN}$) o de bajo umbral ($< 5.7 \text{ mN}$).

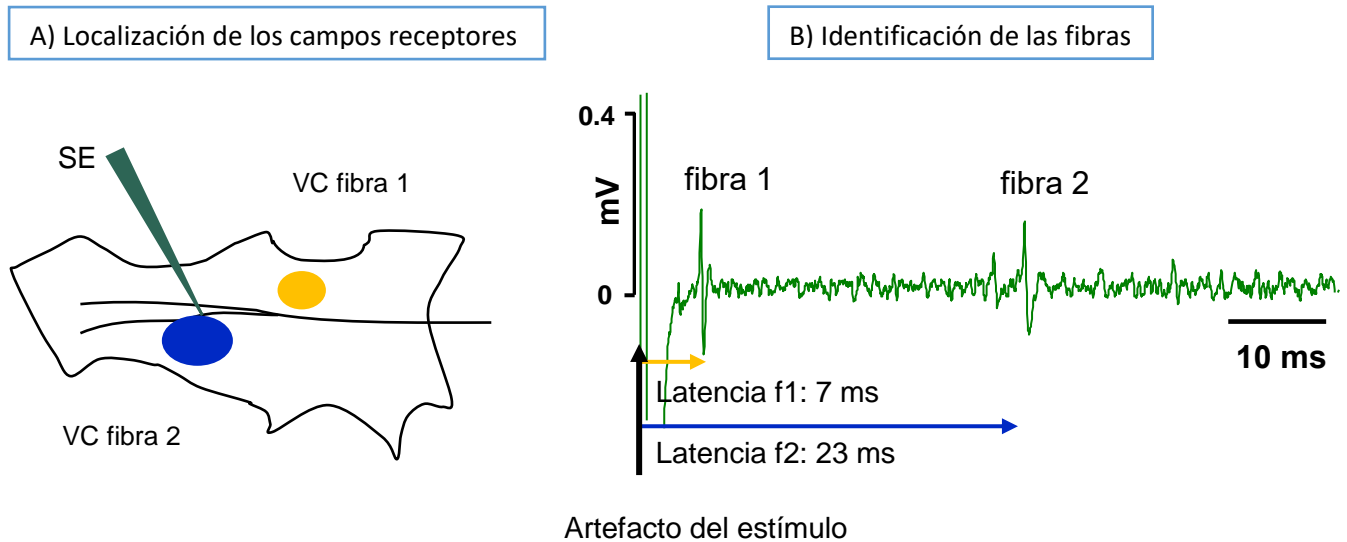


FIGURA 6. Registro de la actividad eléctrica. (A) Localización de los campos receptores y estimulación eléctrica con el SEL. **(B)** Identificación del tipo de fibra nerviosa registrada según su velocidad de conducción.

2. CULTIVOS PRIMARIOS

2.1. Cultivo primario de neuronas ganglios de raíz dorsal (DRGs)

El cultivo primario de neuronas de ganglios de raíz dorsal (DRGs) se realizó a partir de protocolos modificados de Cabrera y colaboradores (Cabrera et al., 2015). Los ratones recién nacidos (día posnatal 0-2) se sacrificaron por decapitación y rápidamente se extrajeron los ganglios raquídeos, que se mantuvieron en frío en medio mínimo esencial (MEM, Gibco, EEUU). Después de retirar las raíces, se realizaron dos disgregaciones enzimáticas consecutivas a 37 °C durante 10 min; la primera con colagenasa 1 mg/mL (Worthington, EEUU), y la segunda con tripsina 0.25% (Sigma-Aldrich, EEUU). Finalmente se realizó una disgregación mecánica y se sembró en Medio Eagle Modificado de Dulbecco Ham's F12 (DMEM-F12, Gibco, EEUU) suplementado con suero de caballo (Gibco, EEUU) 10% (v/v) y NGF 50 ng/mL (Tebu-Bio, Francia). A las 24 h, se añadió al cultivo afidicolina 5 ng/mL (A.G. Scientific, EEUU) para inhibir la replicación de las células no neuronales. El cultivo se mantuvo a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ 5%:aire 95%. Las células se sembraron sobre diferentes placas pre-tratadas con poli-L-lisina (Sigma-Aldrich, EEUU) (50 µg/mL para vidrio y 10 µg/mL

para plástico) y laminina (Sigma-Aldrich, EEUU) (1 µg/mL) y a diferente densidad según su posterior uso. Los experimentos se realizaron a 2-4 DIV.

2.2. Cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo

El cultivo primario de neuronas granulares de cerebelo se realizó a partir de protocolos modificados de Kouzoukas y colaboradores (Kouzoukas et al., 2013). Los ratones de día posnatal 6-8 se sacrificaron por decapitación y rápidamente se extrajo el cerebelo, que se mantuvo en frío en PBS suplementado con 1% de albúmina de suero bovino (BSA) y glucosa 6 mM (PBS_{sup}). Después de retirar las meninges y los vasos sanguíneos, el cerebelo se cortó en pequeños trozos para facilitar su posterior disgregación enzimática con papaína 0.4 mg/mL (Roche, Alemania) en PBS suplementado a 37 °C durante 15 min. A continuación se realizó una disgregación mecánica, en presencia de DNasa (Roche, Alemania), utilizando pipetas de vidrio de diferente grosor. Las células disociadas se recogieron por centrifugaron (1250 rpm, 5 min) y se sembraron en su medio de crecimiento. El medio de crecimiento consistió en MEM suplementado con suero fetal bovino 10% (v/v), KCl 25 mM, glucosa 30 mM, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL. A las 48 h (día *in vitro*, DIV, 2), se añadió al cultivo citosina arabinosa (Ara-C) 10 µM para inhibir la replicación de las células no neuronales. El cultivo se mantuvo a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ 5%:aire 95%. La mitad del volumen del medio de cultivo se reemplazó por medio fresco cada 2 días. Las células se sembraron sobre diferentes placas pre-tratadas con poli-L-lisina y laminina y a diferente densidad según su posterior uso. Los experimentos se realizaron a 3-5 DIV.

2.3. Cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs)

El cultivo primario de fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) se realizó a partir de protocolos modificados de Tremml y colaboradores (Tremml et al., 2008). A partir de una hembra adulta sacrificada por dislocación cervical, se extrajeron los embriones de día 13 ó 14, que se mantuvieron en frío en PBS_{sup}. A continuación se retiraron todos los órganos internos y vísceras dejando únicamente la carcasa del embrión. Ésta se transfirió a una placa con tripsina 0.25%-EDTA 0.02% donde se cortó en pequeños trozos para facilitar su posterior disgregación enzimática 37 °C durante 30 min. Tras la digestión se eliminó la tripsina y se añadió medio de

crecimiento para realizar la disgregación mecánica con pipeta. La suspensión se dejó entonces reposar durante 1 min para permitir que los tejidos no digeridos sedimentaran y recoger el sobrenadante en un nuevo tubo. Se volvió a añadir medio de cultivo sobre los tejidos no digeridos para repetir el proceso. Finalmente, la suspensión celular se sembró en placas de cultivo P100 (Falcon, España) (1-2 placas por embrión) en Medio Eagle Modificado de Dulbecco (DMEM, Gibco, EEUU) suplementado con suero fetal bovino 10% (v/v), glutamina 2 mM, penicilina 100 U/mL y estreptomicina 100 µg/mL. A las 24 h, se eliminó el medio, se lavó 2 veces con PBS y se añadió medio fresco. El cultivo se mantuvo a 37 °C en una atmósfera humidificada con CO₂ 5%:aire 95%. En el momento en el que se alcanzaba el 80-90% de confluencia se procedía al pase. Brevemente, los MEFs se trataban con tripsina 0.25%-EDTA 0.02% durante 5 min a 37 °C para levantarlos de la placa de cultivo. A continuación se añadía medio de crecimiento para inactivar la tripsina y se centrifugaba (1380 rpm, 5 min). El pellet resultante con las células se resuspendía en medio de crecimiento y se sembraba a una dilución 1/3. En el momento de realizar el pase se sembraban también las células para realizar los experimentos (24h antes). Los MEFs se mantuvieron en cultivo hasta 5-6 pases para evitar la inmortalización.

2.4. Fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de *ADCK2*

Los fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) de *ADCK2* fueron proporcionados por el laboratorio del Dr. Plácido Navas Lloret (Centro Andaluz de Biología del Desarrollo, Universidad Pablo de Olavide, Sevilla) a pase 0. En este caso el medio de crecimiento DMEM se suplementó con suero fetal bovino 10% (v/v), aminoácidos no esenciales-MEM 1%, antibiótico/antimicótico 100X (Gibco, EEUU) y uridina 50 µg/mL (Sigma-Aldrich, EEUU).

3. EXPERIMENTOS CON CÉLULAS

3.1 Tratamiento de las células con Fura2-AM para la determinación de Ca²⁺_{cit.}

Las células se sembraron en cubres de vidrio de 12 mm de diámetro en placas de 24 pocillos (Falcon, España). La densidad de siembra fue de: 6×10^5 células por pocillo para las neuronas granulares de cerebelo, 3×10^4 células por pocillo sembradas en gota para las neuronas DRGs, y 1.5×10^5 células por pocillo para los MEFs.

Los cubres con las células se incubaron durante 30 min en solución de carga con la sonda fluorescente ratiométrica Fura-2AM 5 μ M (Molecular Probes, Invitrogen, EEUU) y plurónico F.127 50 μ M (Molecular Probes, Invitrogen, EEUU). La solución de carga consiste en solución salina-HEPES (HCSS) (NaCl 120 mM, MgCl₂ 0.8 mM, KCl 5.4 mM, HEPES 25mM, pH 7.4) con glucosa 2.5 mM (para las neuronas) ó 10 mM (para los MEFs). A continuación se retiró la solución de carga con la sonda y los cubres se lavaron durante 30 min con solución de carga con CaCl₂ 2 mM. Los cubres se montaron entonces con el correspondiente medio en una cámara hecha a medida para su observación en un Axiovert 75M con objetivo Neofluar 40X/0.75 (Zeiss, Alemania). Se determinó la razón de fluorescencia excitando alternativamente la sonda libre de Ca²⁺ (F380) y unida a Ca²⁺ (F340), y recogiendo la emisión a 510 nm. Las imágenes se registraron cada 5 s y para su análisis se utilizó el programa Aquacosmos 2.5 (Hamamatsu, Japón) seleccionando células independientes como regiones de interés (ROIs).

3.1.1. Estudio del mecanismo del SOCE

El análisis del mecanismo SOCE se realizó utilizando un protocolo estándar (Gonzalez-Sanchez et al., 2017). Brevemente, después de obtener un registro basal durante 2 minutos, se induce el vaciamiento de Ca²⁺ del retículo endoplásmico (RE) en medio HCSS libre de Ca²⁺ utilizando carbacol 250 μ M (Sigma-Aldrich, EEUU), como agonista de los receptores muscarínicos acoplados a proteínas G que moviliza el Ca²⁺ del RE a través de receptores IP₃, o tapsigargina 1 μ M (Alomone Labs, Israel), que es un inhibidor de la Ca²⁺-ATPasa del RE (SERCA), y tras 4 minutos se activa el mecanismo SOCE añadiendo Ca²⁺ a una concentración final de 2 mM. Para finalizar se comprueba la excitabilidad de las neuronas testadas añadiendo KCl 30 mM (minuto 9). En los experimentos con los inhibidores del SOCE estos se añadieron al principio del experimento a las dosis indicadas: 2-APB (Life Technologies, Invitrogen, EEUU), YM-58483 (Biogen, Suiza), LaCl₃ (Life Technologies, Invitrogen, EEUU) y GdCl₃ (Sigma-Aldrich, EEUU).

3.1.2. Estudio del contenido de Ca^{2+} del RE

El análisis del contenido de Ca^{2+} del RE se realizó después de añadir el ionóforo Br-A23 1 μM (Sigma-Aldrich, EEUU) en el minuto 1, en medio HCSS libre de Ca^{2+} con EGTA 1 mM.

3.1.3. Estudio de la respuesta de TRPV1

El análisis de la respuesta de Ca^{2+} mediada por el receptor TRPV1 se realizó a partir de un protocolo modificado de Karai y colaboradores (Karai et al., 2004b). En medio HCSS con Ca^{2+} 2 mM se activa el receptor TRPV1 añadiendo capsaicina 1 μM (Sigma-Aldrich, EEUU) en el minuto 1 y taspigargina 1 μM (Alomone Labs, Israel) en el minuto 5 para producir el vaciamiento de Ca^{2+} del RE.

3.1.4. Estudio de la respuesta de calcio a H_2O_2

El análisis de la respuesta de Ca^{2+} mediada por agentes inductores del PTP como H_2O_2 se realizó añadiendo secuencialmente H_2O_2 0.5 mM (Sigma-Aldrich, EEUU) (minuto 6), oligomicina 6 μM (Sigma-Aldrich, EEUU) (minuto 16) y el protonóforo cianuro de 4-carbonil-(trifluorometoxi) fenilhidrazona (FCCP) 4 μM (Sigma-Aldrich, EEUU) (minuto 30) al final del ensayo para despolarizar completamente las mitocondrias, todo ello en medio HCSS con Ca^{2+} (2 mM).

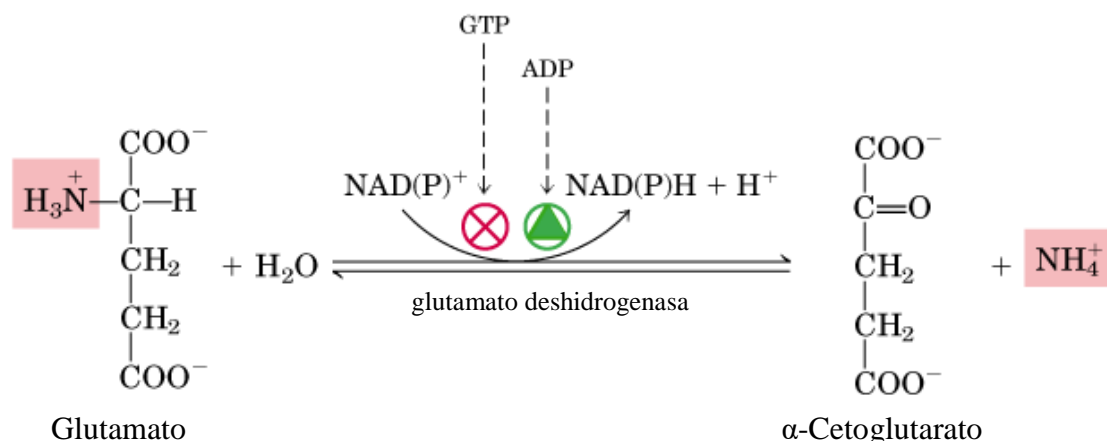
3.2 Determinación de las señales de Ca^{2+} de la membrana plasmática ($\text{Ca}^{2+}_{\text{memb.}}$) y de la mitocondria ($\text{Ca}^{2+}_{\text{mit.}}$)

Las células se sembraron en placas Lab-Tek de 4 pocillos (Nunc, Dinamarca) con fondo de vidrio. La densidad de siembra fue de: 3×10^5 células por pocillo para las neuronas granulares de cerebelo, 3×10^4 células por pocillo sembradas en gota para las neuronas DRGs, y 1.5×10^5 células por pocillo para los MEFs. Las células se transfectaron (protocolo de fosfato cálcico (Jiang and Chen, 2006)) 48 h antes del experimento con el plásmido pcDNA-lynD3cpv (plásmido 37472, Addgene; (Palmer et al., 2006)) dirigido a la membrana plasmática, o con el plásmido pcDNA-4mtD3cpv (plásmido 36324, Addgene; (Palmer et al., 2006)) dirigido a la mitocondria. Las células se excitaron a 100 ms a 436/20 nm y la fluorescencia emitida se

detectó a través de un pase dual dicroico CFP-YFP (alternando 440/500 nm para CFP y 510/600 nm para cpV). Las imágenes se registraron cada 5 s usando una rueda de filtros (Lambda 10-2, Sutter Instruments; todos los filtros se compraron a Chroma) y se recogieron con una cámara Hamamatsu C9100-02 montada en un microscopio invertido Axiovert 200M equipado con un objetivo 63X/1.4 oil Plan-Apochromat Ph3 (Zeiss, Alemania). Se determinó la razón de emisión cpV/CFP y se seleccionaron como ROIs las áreas de somas y neuritas. La señal de fluorescencia de cada célula única se analizó usando los programas Metamorph 7.1 r2 Software (Universal Imaging) y Fiji (NIH) (Gonzalez-Sanchez et al., 2017), eliminado la señal de fondo con el comando “Subtract background” de Fiji. Los experimentos se realizaron igual que los de análisis del mecanismo SOCE y de la respuesta de Ca^{2+} mediada por H_2O_2 para Ca^{2+} citosólico.

3.3 Medida de la liberación de glutamato

El análisis de la liberación de glutamato por parte de las neuronas DRGs se realizó a partir de protocolos modificados de Lund y colaboradores (Lund and Wiggins, 1986) y de Sim y colaboradores (Sim et al., 2006). Las células se sembraron en placas de 48 pocillos a una densidad de siembra de 1×10^5 células por pocillo. El experimento se realizó a 3-4 DIV. Brevemente, al inicio del experimento se retiró el medio de crecimiento y las células se incubaron 30-40 min a 37°C en medio Tris-EDTA (Tris 0.1 M, EDTA 2 mM, pH 9) suplementado con glucosa 2.5 mM, CaCl_2 2 mM, β -NAD 30 mM (Sigma-Aldrich, EEUU), ADP 100 mM (Sigma-Aldrich, EEUU) y el enzima glutamato deshidrogenasa (GIDH) 12 U/mL (Roche, Alemania), a un volumen total de 250 μL por pocillo. Al mismo tiempo se realizó en las mismas condiciones una curva patrón con concentraciones conocidas de glutamato (desde 0-75 μM). Terminado el tiempo de incubación, se determinó la fluorescencia emitida por el NADH formado en la reacción (Fig. 7) como medida de la liberación de glutamato.



(página anterior) **FIGURA 7. Reacción enzimática de la glutamato deshidrogenasa empleada para la medida de liberación de glutamato en las neuronas DRGs.** La glutamato deshidrogenasa (GIDH) es un enzima alostérico que cataliza la deaminación oxidativa del glutamato. Resulta inhibida por moduladores específicos como GTP, ATP y NADH, y estimulado por ADP, GDP y algunos aminoácidos. El NAD(P)H formado durante la reacción tiene propiedades fluorescentes, con un pico de emisión a 460 nm, lo que permite su utilización como medida de la cinética enzimática.

La fluorescencia emitida por la formación de NADH se monitorizó usando un lector de placas FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH, Alemania) usando un filtro de excitación 340-10 nm y de emisión 470-10 nm. El experimento se realizó a una temperatura de 37 °C para mantener la viabilidad de las neuronas.

Para la recta patrón de glutamato se realizó una medida única, con triplicados para cada concentración. En los ensayos con las neuronas DRGs se realizaron medidas cada 2 s y se realizó la adición secuencial de capsaicina (CAP) y tritón X-100 (Tx-100) mediante un controlador de flujo. Primero se midió la fluorescencia basal durante 30 s, al finalizar el ciclo 15 (min 0.5) se añadió CAP 5 μ M, al finalizar el ciclo 150 (min 2.5) se realizó la segunda estimulación con CAP 10 μ M. Finalmente, tras el ciclo 270 (min 4.5) se añadió Tx-100 0.5% para inducir la liberación del pool restante de glutamato en las células. Utilizando la recta patrón de glutamato se calcularon las concentraciones de glutamato equivalentes para las señales de fluorescencia y se determinó el glutamato liberado en cada adición. El cálculo del glutamato total liberado por las neuronas DRGs en cada ensayo se estimó como la suma del glutamato liberado tras las dos estimulaciones con capsaicina más el glutamato liberado tras la adición final de tritón X-100. Los porcentajes de glutamato liberados en cada estimulación se calcularon respecto al glutamato total liberado en cada ensayo.

3.4 Medida del consumo de oxígeno celular (OCR)

La razón de consumo de oxígeno (OCR, de sus siglas en inglés *oxygen consumption rate*) se midió utilizando un analizador de flujo extracelular Seahorse KF24 (Seahorse KF24 Extracellular Flux Analyzer, Seahorse Bioscience-Agilent, EEUU) (Qian and Van Houten, 2010). Las células se sembraron en placas de cultivo celular XF24 V7 a una densidad de siembra de: 8×10^5 células por pocillo para las neuronas granulares de cerebelo, 1×10^5 células

por pocillo para las neuronas DRGs, y 2×10^5 células por pocillo para los MEFs. Durante la hora previa al experimento las células se incubaron en medio DMEM libre de bicarbonato (sin piruvato, lactato, glucosa, glutamina y Ca^{2+}) suplementado con glucosa 2.5 mM (para las neuronas) ó 10 mM (para los MEFs) y CaCl_2 2 mM. Los sustratos se prepararon en el mismo medio en el que se realizaron los ensayos y fueron inyectados automáticamente desde los pocillos para reactivos a los pocillos con las células a los tiempos indicados. La caracterización bioenergética de las células se realizó mediante la adición secuencial de oligomicina 6 μM , 1,4-dinitrofenol (DNP) 0.25 mM, y antimicina A 1 μM /rotenona 1 μM (todos de Sigma-Aldrich, EEUU). Esto permitió la cuantificación del consumo de oxígeno basal, el consumo de oxígeno asociado a la síntesis de ATP (OCR sensible a oligomicina), la respiración máxima no acoplada (respiración máxima), y el consumo de oxígeno no mitocondrial.

3.4.1 Estimulación de la respiración mitocondrial

En los experimentos de estimulación de la respiración mitocondrial estos se añadieron previamente a la caracterización bioenergética (carbacol 250 μM , tapsigargina 1 μM , ATP 100 μM (Sigma-Aldrich, EEUU), capsaicina 1 μM) y se midió el porcentaje de estimulación a los 3 min.

3.5 Medida de la capacidad de retención de calcio (CRC) mitocondrial

La captura de Ca^{2+} por parte de la mitocondria se midió por los cambios de fluorescencia de la sonda Calcium Green-5N (0.1 μM , excitación 506 nm, emisión 532 nm) (Molecular Probes, Invitrogen, EEUU) utilizando un fluorímetro (Aminco-Browman Series 2 luminiscence spectrometer, Thermo Electron Corporation, EEUU) en medio MSK sin EDTA (manitol 75 mM, sacarosa 25 mM, KH_2PO_4 5 mM, Tris-HCl 20 mM, KCl 100 mM, pH 7.4) suplementado con MgCl_2 1 mM, a un volumen final de 2 mL. Los ensayos se realizaron a 30 °C con agitación en presencia de sustrato respiratorio (succinato 5 mM + rotenona 2 μM) y de ADP 1 mM, de digitonina 100 μM (Sigma-Aldrich, EEUU), para permeabilizar las células, y en presencia de tapsigargina 1 μM para impedir la captación de Ca^{2+} por parte del RE. El ensayo comienza con la adición de las células (1×10^6 MEFs/ensayo). Tras 2-3 min de registro basal se realizaron adiciones repetidas de 0.025 nmoles de Ca^{2+} hasta detectar la apertura del PTP. En algunos ensayos se utilizó rojo de rutenio 200 nM (Calbiochem, Merck, Alemania), como control para

inhibir el uniportador de Ca^{2+} mitocondrial (MCU), o ciclosporina A (CsA) 1.5 μM (Sandoz, Novartis, Suiza) para inhibir la apertura del PTP (Traba et al., 2012). Para cada adición de 0.025 nmoles de Ca^{2+} se determinó la cantidad relativa de calcio tamponada por las células en función de la señal de fluorescencia máxima y mínima antes y después de la adición; la CRC se estimó como la suma de las cantidades relativas tamponadas en las sucesivas adiciones de calcio hasta la apertura del PTP. Respecto a la velocidad de captura de Ca^{2+} , se calculó la media de las pendiente de los 5 primeros segundos tras la primera adición de Ca^{2+} la adición.

3.6 Medida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$)

3.6.1 TMRM

El potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) se estimó mediante el uso de la sonda tetrametilrodamina metil éster (TMRM) (Molecular Probes, Invitrogen, EEUU), que se acumula en la mitocondria de forma dependiente al potencial de membrana, en modo de no-desactivación (*non-quench mode*) (Davidson et al., 2007, Rueda et al., 2015). Las células se sembraron 24h antes de realizar el experimento en placas Lab-Tek de 4 pocillos (Nunc, Dinamarca) a una densidad de 1.5×10^5 células por pocillo. En el momento de empezar el experimento el medio se reemplazó por tampón Krebs-Ringer modificado (mKRB): NaCl 135 mM, KCl 5 mM, MgSO_4 1 mM, K_2HPO_4 0.4 mM, HEPES 20 mM, pH 7.4 (Traba et al., 2012), suplementado con glucosa 10 mM, CaCl_2 2 mM y TMRM 20 nM. Las células se incubaron a 37 °C durante 30 min y se montaron en el microscopio. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron cada 2 min en un microscopio invertido Axiovert 200M (Zeiss, Alemania), equipado con una fuente de luz xenón (75W/2) para iluminación de epifluorescencia y con una cámara CCD termostatzada (Cell Observer, Zeiss). Para la detección de la fluorescencia se usaron los filtros de 500-540 nm para excitación y 590-650 nm para emisión. Las imágenes se registraron con una cámara Hamamatsu C9100-02 con tiempo de exposición de 40 ms usando un objetivo 63X/1.4 oil Plan-Apochromat Ph3 (Zeiss, Alemania). Las imágenes se adquirieron y analizaron usando los programas Metamorph 7.1 r2 Software (Universal Imaging) y Fiji (NIH), tomando cada célula única como ROI y la señal fluorescencia de su núcleo como fondo.

3.6.1.1 Cálculo del potencial basal

Para calcular el potencial de membrana basal, se añadió oligomicina 6 μM para obtener el valor máximo del $\Delta\psi$ y FCCP 4 μM al final del ensayo para despolarizar completamente las mitocondrias y obtener el valor mínimo del $\Delta\psi$. El valor de $\Delta\psi$ basal se calculó como el porcentaje respecto a la señal mitocondrial total.

3.6.1.2 Determinación de la apertura del PTP en célula única por pérdida del potencial de membrana ($\Delta\psi$)

a) Oligomicina

Para determinar la apertura del PTP por pérdida del $\Delta\psi$, después de registrar la señal basal durante 16 minutos, se trató las células con oligomicina 6 μM durante 14 minutos. Finalmente, se añadió FCCP 4 μM (minuto 30) para despolarizar completamente las mitocondrias (Zulian et al., 2014). Se analizó la señal de cada célula, corregida respecto al fondo, y normalizada como el porcentaje de intensidad de fluorescencia respecto a los valores iniciales.

b) Agentes inductores

Para estudiar la sensibilidad a agentes movilizadores de Ca^{2+} del RE (H_2O_2 y bradiquinina), se realizó la adición de H_2O_2 0.5 mM o de bradiquinina 2.5 μM (Peninsula Laboratories LLC, EEUU) a los tiempos indicados (minuto 6) y 10 minutos después se añadió oligomicina 6 μM . Al final de cada experimento, se añadió FCCP 4 μM para despolarizar completamente las mitocondrias (Zulian et al., 2014). Se analizó la señal de cada célula, corregida respecto al fondo, y normalizada como el porcentaje de intensidad de fluorescencia respecto a los valores iniciales.

3.6.1.3 Análisis de la morfología mitocondrial

El análisis de la morfología mitocondrial se realizó usando el programa Fiji (NIH), a partir de imágenes de la señal de fluorescencia TMRM en condiciones basales, determinando el tamaño medio, perímetro y circularidad de mitocondrias independientes. Para ello, se tomaron regiones del citoplasma de células independientes, se eliminó el fondo y se estableció como umbral la señal de fluorescencia de mitocondrias aisladas, realizando el análisis de las partículas

resultantes para calcular los parámetros indicados anteriormente con la herramienta “*Analyze particles*”.

3.6.2 JC-1

En el caso de los MEFs SCaMC3 se realizaron experimentos complementarios con la sonda JC-1 (5 μ M, excitación 514 nm, emisión 532 nm/590 nm) (Molecular Probes, Invitrogen, EEUU) para asegurar la fiabilidad del TMRM como indicador del $\Delta\psi$ basal (Behbahani et al., 2006). Igual que en los experimentos de TMRM, las células se sembraron 24h antes de realizar el experimento en placas Lab-Tek de 4 pocillos (Nunc, Dinamarca) a una densidad de 1.5×10^5 células por pocillo. La sonda se incubó en medio mKRB suplementado con glucosa 10 mM y CaCl_2 2 mM a 37 °C durante 30 min. Se tomaron imágenes simultáneamente en los canales rojo (Ds-Red) y verde (GFP) cada 30 segundos en un microscopio invertido Axiovert 200M (Zeiss, Alemania), equipado con una fuente de luz xenón (75W/2) para iluminación de epifluorescencia y con una cámara CCD termostatzada (Cell Observer, Zeiss). Las imágenes se registraron con una cámara Hamamatsu C9100-02 con tiempo de exposición de 40 ms usando un objetivo 63X/1.4 oil Plan-Apochromat Ph3 (Zeiss, Alemania) y se adquirieron usando el programa Metamorph 7.1 r2 Software (Universal Imaging). Finalmente usando el programa Fiji (NIH) se analizó la señal fluorescencia de cada canal, tomando cada célula única como ROI, y se calculó la razón entre la señal roja/verde.

3.7 Medida de la muerte celular

Las células se sembraron 24 horas antes de realizar el experimento en placas de 24 pocillos a una densidad de 1.5×10^5 células por pocillo.

Para determinar la muerte celular, las células se incubaron con la sonda acetoximetil ester de calceína (calcein-AM, 1 μ M) (Molecular Probes, Invitrogen, EEUU), resultando en la fluorescencia de la calceína en el citoplasma de las células vivas, y con yoduro de propidio (PI, 2 μ M) (ThermoFischer, EEUU), que se introduce sólo en las células dañadas para marcar el núcleo de las células muertas. Después de retirar el medio de crecimiento y hacer un lavado, ambas sondas se incubaron a 37 °C durante 30 min en medio mKRB suplementado con glucosa 10 mM y CaCl_2 2 mM. Finalmente se tomaron al menos 10 imágenes por condición en un microscopio de fluorescencia AF6000 LX (Leica, Alemania) con cámara Andor 885 EM

usando un objetivo 10× seco para los canales rojo (Ds-Red) y verde (GFP). Las imágenes se adquirieron con el programa Leica LAS AF (Leica, Alemania). Finalmente, se contaron las células rojas (positivas para PI) y verdes (positivas para calceína), usando el programa de procesamiento de imágenes Fiji (NIH), y se analizó el porcentaje de células muertas respecto al total de células.

3.7.1 Muerte sensible a PTP

Para establecer la dosis adecuada, se ensayaron dos concentraciones de H₂O₂ (0.5 y 1 mM) y se analizaron las células a diferentes tiempos de incubación (2.5, 3, 3.5, 4 y 4.5 horas). Los diferentes tratamientos se realizaron en medio mKRB suplementado con glucosa 10 mM y CaCl₂ 2 mM, con sus correspondientes controles. Para determinar la dependencia de la muerte observada con el PTP, se suplementó el medio con CsA 1.5 μM para inhibir la apertura del poro.

3.7.2 Muerte independiente de PTP

De igual modo que con el tratamiento de H₂O₂, se ensayaron diferentes concentraciones y tiempos en el tratamiento con estaurosporina (Abcam, Reino Unido): 1, 2, 5 y 10 μM, durante 5, 6.5 y 9 h.

4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó usando el programa Statistica 7.0 (StatSoft, EEUU). El análisis de los tests de comportamiento se realizó mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores con medidas repetidas, usando el genotipo y la edad como factores inter-sujetos y los distintos tiempos de respuesta (latencia) como el factor intra-sujetos. Posteriormente se utilizó el test post hoc de Tukey para evaluar las diferencias entre grupos (Ruiz-Medina et al., 2013). En general para la comparación entre genotipos WT y KO se utilizó el test de Student pareado de dos colas, excepto cuando se indica que se realizó una ANOVA de dos factores, seguido del test post hoc de Bonferroni. La significación está indicada como: *n.s.* no significativo, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LA SENSIBILIDAD NOCICEPTIVA EN LOS RATONES *Gdap1-knock out* (*Gdap1-KO*)

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) se caracteriza por debilidad muscular y pérdida motora y sensitiva que comienza en los miembros distales y progresa en función de la longitud de éstos (Sevilla et al., 2008). El ratón *Gdap1-knock out* (*Gdap1-KO*) modelo de la enfermedad CMT presenta déficits motores, muerte de motoneuronas y alteraciones en las uniones neuromusculares, entre otros fallos asociados al componente motor de la enfermedad CMT (Barneo-Munoz et al., 2015). Sin embargo, el componente sensitivo de la enfermedad no ha sido hasta el momento estudiado en el modelo murino.

1.1 Los ratones *Gdap1-KO* muestran menor sensibilidad nociceptiva térmica y mecánica en ensayos de comportamiento *in vivo*

Se estudió en primer lugar la sensibilidad de los ratones *Gdap1-KO* ante estímulos térmicos nocivos utilizando el test de comportamiento conocido como *plantar test* o test de Hargreaves (Hargreaves et al., 1988). Este test consiste en aplicar una luz infrarroja a la pata trasera del animal de modo que cuando la intensidad del estímulo sea capaz de activar nociceptores periféricos de la planta de la pata, se evocará en el animal un reflejo de retirada. El sistema Hargreaves computa de modo automático el tiempo de latencia, o tiempo que transcurre desde que se aplica el estímulo hasta que el ratón retira la pata. Mayores tiempos de latencia indicarían un déficit en la detección de estímulos térmicos nociceptivos. Se testaron los mismos grupos de hembras y de machos de manera independiente, desde 1 mes de edad hasta los 11 meses. La figura 1A muestra que la latencia era mayor en hembras *Gdap1-KO*, indicando un déficit en la detección de ese tipo de estímulos. Se realizó el análisis de la varianza (ANOVA) de tres factores (latencia, genotipo y edad) con medidas repetidas (distintas medidas en pata derecha e izquierda), usando el genotipo y la edad como factores inter-sujetos y los distintos tiempos de respuesta como el factor intra-sujetos (Ruiz-Medina et al., 2013). El análisis del genotipo muestra que las hembras *Gdap1-KO* tienen una latencia de 9.989 ± 0.179 segundos, mientras que en los controles *wild type* (WT) era de 3.778 ± 0.176 s ($p < 0.001$). El análisis post hoc (test de Tukey) no muestra diferencias significativas en la latencia respecto a la edad. De igual forma, la latencia en los machos *Gdap1-KO* también fue mayor (Fig. 1B). El análisis del genotipo muestra que los machos *Gdap1-KO* tienen una latencia de 10.313 ± 0.181 segundos, mientras que los controles WT tienen una latencia de 4.131 ± 0.184 s ($p < 0.001$). El análisis post hoc (test de Tukey) tampoco muestra diferencias significativas en la latencia respecto a la edad.

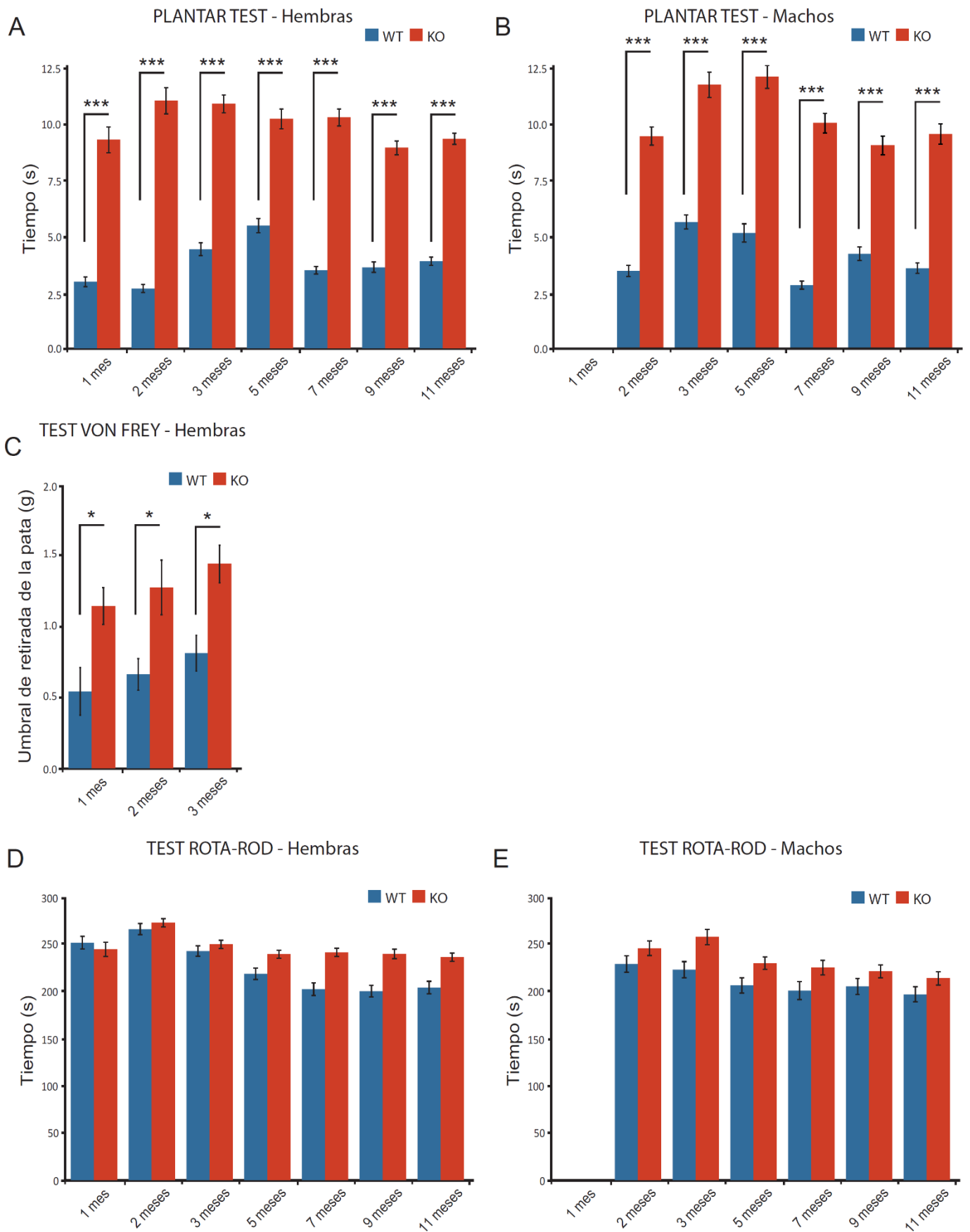


FIGURA 1. Los ratones *Gdap1*-KO muestran menor sensibilidad nociceptiva térmica y mecánica, sin fallos motores significativos, en ensayos de comportamiento *in vivo*. (A, B) Latencia (en segundos) para plantar test:

hembras de 1 a 11 meses (n = 6-17 hembras/genotipo) **(A)** y machos de 2 a 11 meses (n = 5-6 machos/genotipo) **(B)**. **(C)** Umbral de retirada de la pata (en gramos del filamento von Frey aplicado) para test de von Frey: hembras de 1 a 3 meses (n = 6-17 hembras/genotipo). **(D, E)** Latencia de caída (tiempo en segundos) para test rota-rod: hembras de 1 a 11 meses (n = 6-17 hembras/genotipo) **(D)** y machos de 2 a 11 meses (n = 5-6 machos/genotipo) **(E)**. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, comparación entre genotipos (test post hoc Tukey).

A continuación, se estudió la sensibilidad nociceptiva mecánica de estos ratones utilizando el test de von Frey (Chaplan et al., 1994, Bonin et al., 2014). El test de von Frey consiste en aplicar a la pata trasera del animal unos filamentos semirrígidos calibrados que al doblarse sobre la superficie en la que se aplican ejercen una fuerza conocida. Cuando la intensidad de esta fuerza es suficiente como para activar nociceptores periféricos, se evocará en el animal un reflejo de retirada. En este caso se calcula el umbral o fuerza necesaria para evocar una respuesta. Se comienza con un filamento de fuerza intermedia y se van testando filamentos de mayor o menor intensidad en función de si el animal presenta o no una respuesta. En este caso se utilizaron preferentemente hembras jóvenes puesto que, como se comprobó en el *plantar test*, no se observan diferencias asociadas al sexo de los ratones. Al igual que sucedía con el *plantar test*, los ratones *Gdap1*-KO presentan umbrales de retirada más altos (Fig. 1C), es decir, es necesario aplicarles una fuerza mayor para producir una respuesta, lo que implica un déficit en la detección de estímulos mecánicos nociceptivos. Se realizó ANOVA de tres factores (umbral de retirada de la pata, genotipo y edad) con medidas repetidas (distintas medidas en pata derecha e izquierda), usando el genotipo y la edad como factores inter-sujetos y los distintos umbrales de retirada como el factor intra-sujetos. El análisis del genotipo muestra que los ratones *Gdap1*-KO tienen un umbral de retirada más alto que los WT (1.294 ± 0.107 gramos vs. 0.756 ± 0.104 g, $p < 0.01$). El análisis post hoc (test de Tukey) no muestra diferencias significativas en el umbral de retirada respecto a la edad, aunque se observa una tendencia a aumentar.

Para descartar que los déficits descritos anteriormente fueran debidos a un fallo motor, se testó la movilidad de estos ratones utilizando el test rota-rod (Dunham and Miya, 1957, Jones and Roberts, 1968). El test rota-rod consiste en colocar al animal sobre un cilindro que gira a una velocidad creciente y se registra el tiempo que el animal es capaz de mantenerse en movimiento como medida de su capacidad motora. Los ratones *Gdap1*-KO no muestran fallos motores significativos a las edades testadas (Fig. 1D y 1E), aunque se aprecia una tendencia a empeorar con la edad tanto en los ratones control como en los ratones *Gdap1*-KO. Se realizó

ANOVA de tres factores (latencia de caída, genotipo y edad) con medidas repetidas (distintos ensayos en el mismo ratón), usando el genotipo y la edad como factores inter-sujetos y los distintos tiempos de latencia como el factor intra-sujetos. En el caso de las hembras, el análisis del genotipo muestra que los ratones *Gdap1*-KO tienen una latencia ligeramente superior: 241.773 ± 5.374 segundos, respecto a los controles WT que tienen un tiempo de latencia de 222.222 ± 5.289 s ($p < 0.05$). De igual modo, los machos *Gdap1*-KO tienen un tiempo de latencia ligeramente superior: 226.347 ± 6.963 segundos, respecto a los controles WT que tienen un tiempo de latencia de 203.162 ± 7.078 s ($p < 0.05$). El análisis post hoc (test de Tukey) no muestra diferencias significativas en hembras o machos en el tiempo de latencia respecto a la edad, aunque se observa una tendencia a disminuir. Sin embargo, en otros estudios con esta misma cepa de ratón (ver más adelante, estudio de los dobles KO *Gdap1* y *SCaMC-3*) y en los de Barneo-Muñoz y colaboradores (Barneo-Munoz et al., 2015) se observó una clara deficiencia motora en el test de rota-rod, lo que sugiere que la deficiencia se manifiesta de forma desigual en cada individuo. Otros modelos de CMT asociada a GDAP1 no han detectado fallos motores hasta edades mucho más avanzadas (Niemann et al., 2014).

1.2 Los ratones *Gdap1*-KO no presentan alteraciones en las terminaciones nerviosas libres

A continuación, nos propusimos identificar a qué nivel del sistema nervioso se estaba produciendo el fallo en la transmisión de la información nociceptiva. En primer lugar, se analizaron las terminales nerviosas en la piel, donde se recibe el estímulo nocivo, en colaboración con el Dr. Jorge Rubén Cabrera del Leib Laboratory (Geisel School of Medicine–Dartmouth College, USA). Los receptores para el tacto protopático (mecanorreceptores de alto umbral no dolorosos), los estímulos térmicos y dolorosos son morfológicamente terminaciones nerviosas libres (desnudas) (en inglés, *free nerve endings* o FNE), es decir carecen de células receptoras especializadas y de cápsulas.

A partir de biopsias de la piel plantar de las patas traseras del ratón, se realizó el marcaje de las terminales nerviosas por inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-PGP 9.5, un marcador pan-neuronal. Se analizó la distribución y el número de FNEs en ratones WT y *Gdap1*-KO y, como muestra la figura 2, no se observan diferencias entre genotipos en la distribución y/o número por campo de FNE.

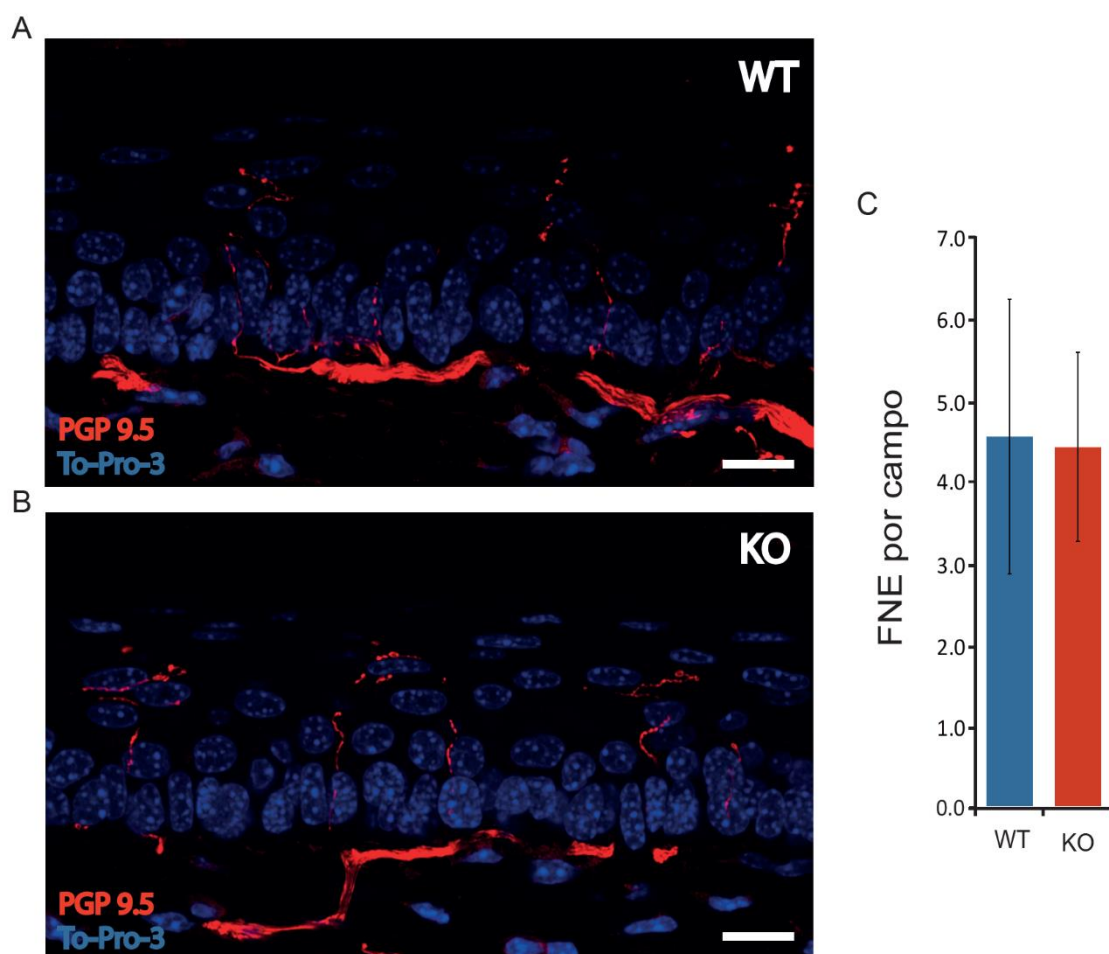


FIGURA 2. Los ratones *Gdap1*-KO no presentan alteraciones en las terminaciones nerviosas libres. (A, B) Imágenes representativas de la piel plantar de un ratón WT (A) y un ratón *Gdap1*-KO (B). Las FNEs están marcadas con anti-PGP 9.5 (rojo), un marcador pan-neuronal, y los núcleos celulares con To-Pro-3 (azul). Las imágenes muestran la proyección de al menos 3 planos. Barra de escala 10 μm. (C) La gráfica representa el número de FNEs por campo. Se analizaron 8-10 secciones, al menos 28 campos, por genotipo. Los datos están expresados como media ± SEM, test de Student pareado de dos colas.

1.3 Los ratones *Gdap1*-KO muestran alteraciones electrofisiológicas en respuesta a estímulos mecánicos

El siguiente paso fue caracterizar electrofisiológicamente las fibras sensoriales cutáneas, con especial atención a las encargadas del mensaje nociceptivo. Para ello se realizaron estudios de electrofisiología en el Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá en colaboración con la Dra. Carolina Roza y el Dr. Jose Antonio López García. Utilizando la técnica de *skin-nerve* se identificó en primer lugar mediante estimulación mecánica el campo receptor de la piel asociado a la fibra nerviosa del nervio safeno que estamos registrando. A continuación, se identificó mediante estimulación eléctrica el tipo de fibra nerviosa registrada

en función de la velocidad de conducción (VC) de ésta (calculada a partir de la latencia de los potenciales de acción y la distancia al campo receptor). Finalmente, se testaron diferentes estímulos mecánicos (filamentos von Frey calibrados) para establecer el umbral de respuesta de la fibra registrada. Con esta técnica se pudo comprobar que, al igual que sucedía en los ensayos de comportamiento *in vivo*, los ratones *Gdap1*-KO muestran alteraciones en la sensibilidad mecánica (Fig. 3). Como muestra la figura 3A, la ausencia de GDAP1 produce cambios en la distribución de las fibras mecano-sensibles: desaparecen (fibras C) o disminuyen drásticamente (fibras A δ) las fibras de bajo umbral (≤ 5.7 mN) y aumentan las fibras C y A δ de alto umbral (> 5.7 mN). Asimismo, teniendo en cuenta los diferentes tipos de fibras registradas, el umbral de respuesta a estímulos mecánicos es significativamente superior en los ratones *Gdap1*-KO (Fig. 3B). Por lo tanto, el fallo en la detección de estímulos nociceptivos parece localizarse a nivel del sistema nervioso periférico, como sucede en la enfermedad humana de CMT, aunque no pueden descartarse fallos en otros niveles del sistema nervioso.

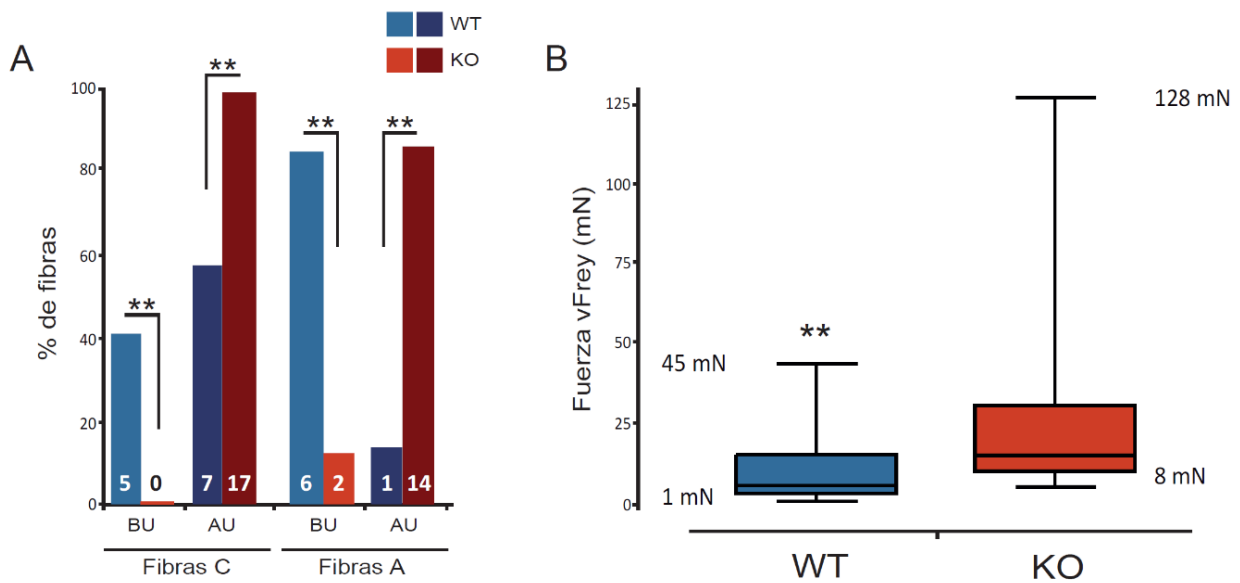


FIGURA 3. Los ratones *Gdap1*-KO muestran alteraciones electrofisiológicas en respuesta a estímulos sensitivos mecánicos. (A) Porcentaje de fibras mecano-sensibles de bajo (≤ 5.7 , BU) y alto (> 5.7 mN, AU) umbral registradas *in vitro* en piel de ratón, en animales control WT y *Gdap1*-KO. Los ratones *Gdap1*-KO no tienen fibras mecánicas de bajo umbral. ** $p < 0.01$, test exacto de Fisher. El número dentro de las columnas indica el n. **(B)** Las fibras mecanosensibles en los ratones *Gdap1*-KO tienen mayor umbral que las de los ratones WT. La diferencia ocurre en fibras A y en fibras C. ** $p < 0.01$, test Mann-Whitney.

2. ESTUDIO DEL MECANISMO MOLECULAR RESPONSABLE DE LAS ALTERACIONES EN LA TRANSMISIÓN NOCICEPTIVA EN LOS RATONES *Gdap1*-KO

Los resultados de comportamiento demuestran que los ratones *Gdap1*-KO presentan un fallo en la sensibilidad nociceptiva a nivel periférico. Los estudios de electrofisiología han permitido identificar que dicho déficit se encuentra en la aferencia primaria nociceptiva, probablemente en la transducción de los estímulos nociceptivos, pero no en la conducción (porque las VCs en animales WT y *Gdap1*-KO eran similares). En cualquier caso, no podemos excluir otros defectos a nivel central.

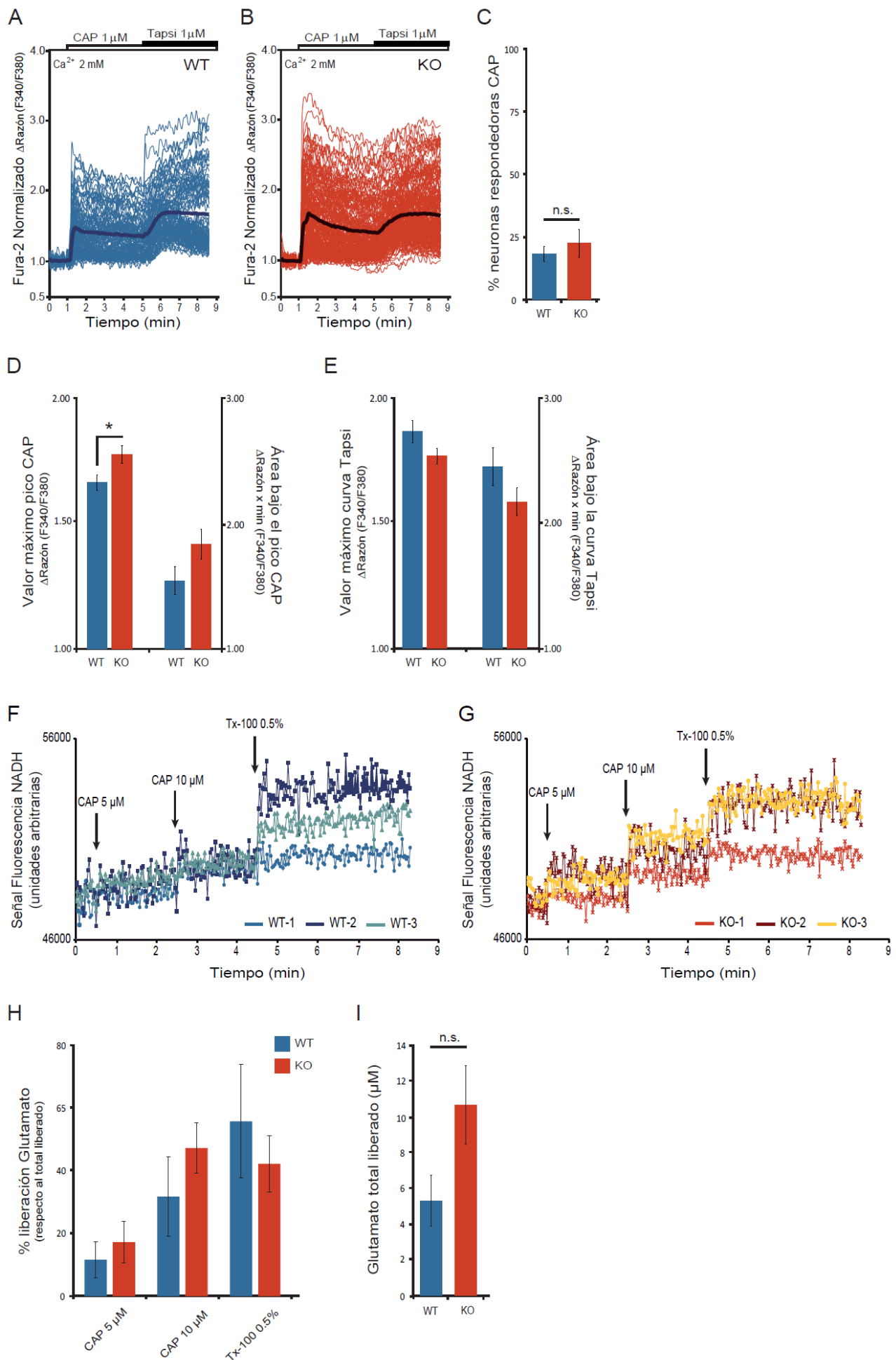
Con objeto de estudiar en detalle el mecanismo molecular responsable de las alteraciones en el nociceptor, hemos llevado a cabo una serie de cultivos primarios en neuronas DRGs, donde se encuentran los cuerpos celulares de las aferencias primarias, y neuronas granulares de cerebelo, como modelo de neurona del SNC.

Para ello, hemos examinado los mecanismos implicados en la respuesta a estímulos nociceptivos en los cuerpos celulares de los nociceptores (neuronas DRGs), y a continuación hemos estudiado de manera más exhaustiva diferentes mecanismos de señalización celular en ambos modelos neuronales.

2.1 MECANISMOS DE RESPUESTA A ESTÍMULOS NOCICEPTIVOS EN LAS NEURONAS DE GANGLIOS DE RAÍZ DORSAL (DRGs)

2.1.1 Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO muestran alteraciones en la señalización nociceptiva por calcio y en la liberación de neurotransmisores

Hemos medido las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en neuronas DRGs tras la estimulación con capsaicina (agonista específico de TRPV1), en presencia de Ca^{2+} extracelular (Fig. 4A y 4B). Paradójicamente, estas señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ son mayores en las neuronas *Gdap1*-KO (Fig. 4B), como nos muestra el análisis del valor máximo del pico CAP, 1.66 ± 0.03 en las neuronas DRGs WT frente a 1.77 ± 0.03 en las *Gdap1*-KO, y el área bajo el pico CAP, 1.54 ± 0.11 frente a 1.83 ± 0.12 en las neuronas DRGs WT y en las *Gdap1*-KO, respectivamente (Fig. 4D). La deficiencia en GDAP1 no afecta significativamente al número de neuronas respondedoras a capsaicina: un $18.18 \pm 3.04\%$ en las neuronas DRGs WT, frente a un $22.34 \pm 5.48\%$ en las neuronas *Gdap1*-KO (Fig. 4C).



(página anterior) **FIGURA 4. Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO muestran alteraciones en la señalización nociceptiva por calcio y en la liberación de glutamato.** (A-E) Determinación de las señales de calcio citosólico ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cit.}}$) en el soma de neuronas DRGs mediante la sonda Fura-2AM. La actividad del receptor TRPV1 se determinó como el incremento en la señal debida a la adición de capsaicina 1 μM en un medio con Ca^{2+} 2 mM. La magnitud de la respuesta SOCE se comparó con la respuesta a tapsigargina 1 μM . (A, B) Experimentos representativos en neuronas DRGs respondedoras CAP WT (A) y *Gdap1*-KO (B). (C) Porcentaje de neuronas respondedoras CAP para cada genotipo. (D) Cuantificación de la actividad TRPV1 como valor máximo y área bajo el pico CAP. (E) Cuantificación de la respuesta a tapsigargina como valor máximo y área bajo la curva Tapsi. Se analizaron más de 600 células de al menos 3 experimentos independientes. (F-I) Determinación de los niveles de liberación de glutamato en neuronas DRGs mediante la fluorescencia NADH en medio Tris-EDTA suplementado con glucosa (2.5 mM), CaCl_2 (2 mM), NAD (30 mM), ADP (100 mM) y GIDH (12 U/mL). La liberación de glutamato se midió como el incremento en la señal de fluorescencia del NADH formado en la reacción enzimática después de la adición de capsaicina (CAP) 5 μM , CAP 10 μM y Tritón X-100 (Tx-100) 0.5%, a los tiempos indicados. Experimentos representativos con neuronas DRGs WT (F) y *Gdap1*-KO (G). (H) Porcentaje de liberación de glutamato, respecto al total liberado en cada experimento, para las distintas adiciones. (I) Glutamato total liberado en cada experimento (calculado en μM respecto a una recta patrón de liberación de glutamato) para neuronas DRGs WT y *Gdap1*-KO. Se analizaron 6 ensayos de 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *n.s.* no significativo, * $p < 0.05$, test de Student pareado de dos colas.

Estos mayores niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit.}}$ en las neuronas *Gdap1*-KO tras la estimulación con capsaicina se pueden explicar por una mayor actividad TRPV1, o un menor tamponamiento del Ca^{2+} por parte del retículo endoplásmico (RE) y la mitocondria, que haría que el calcio se acumulara en el citosol.

En este sentido, esta segunda posibilidad es consistente con la menor salida de Ca^{2+} del RE que se observa en las neuronas *Gdap1*-KO tras la adición de tapsigargina, inhibidor no competitivo de la Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico (SERCA) (Fig. 4B). El análisis del valor máximo de la curva tapsi, 1.86 ± 0.04 en las neuronas DRGs WT frente a 1.76 ± 0.03 en las *Gdap1*-KO, y el área bajo de la curva tapsi, 2.45 ± 0.15 frente a 2.17 ± 0.11 en las neuronas DRGs WT y en las *Gdap1*-KO, respectivamente (Fig. 4E) indica que ambos son menores en el KO.

Como hemos comentado anteriormente, la activación del receptor TRPV1 produce una entrada masiva de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit.}}$, iniciando diversas cascadas de señalización que en última estancia causan entre otros procesos la generación del potencial de acción y la liberación de neurotransmisores, principalmente glutamato. Utilizando neuronas DRGs hemos medido la liberación de glutamato tras la estimulación con capsaicina (Fig. 4F-I). De acuerdo con lo

observado para las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit.}}$, que son mayores en las neuronas *Gdap1*-KO, la liberación de glutamato inducida por capsaicina también es mayor en las neuronas *Gdap1*-KO (Fig. 4F) respecto a las WT (Fig. 4G). El análisis del porcentaje de liberación de glutamato respecto al glutamato total liberado en cada experimento muestra que la liberación de glutamato tras la primera estimulación con CAP 5 μM fue del $11.63 \pm 5.77\%$ en las neuronas DRGs WT frente a $17.24 \pm 6.63\%$ en las *Gdap1*-KO. La segunda estimulación con CAP 10 μM produjo una liberación de glutamato del $31.76 \pm 12.65\%$ en las neuronas DRGs WT frente a $47.24 \pm 7.95\%$ en las *Gdap1*-KO. La adición final de 0.5% Triton-X100 (T-X100) para producir la liberación del glutamato restante fue del $55.77 \pm 18.11\%$ en las neuronas DRGs WT frente a $42.20 \pm 8.96\%$ en las *Gdap1*-KO (Fig. 4H). Teniendo en cuenta las distintas estimulaciones, hemos calculado los niveles totales de glutamato liberados a partir de una recta patrón de liberación de glutamato. Estos niveles fueron superiores en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO, respecto a los controles WT: $5.31 \pm 1.42 \mu\text{M}$ frente a $10.67 \pm 2.19 \mu\text{M}$ en las neuronas DRGs WT y en las *Gdap1*-KO, respectivamente (Fig. 4I).

2.2 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR MEDIADOS POR CALCIO

Los experimentos anteriores confirman que efectivamente existe una alteración en las neuronas DRGs en los mecanismos moleculares responsables de la percepción de la sensibilidad nociceptiva, que a su vez conduce a una liberación alterada de neurotransmisores (glutamato). Paradójicamente, a pesar de que los ratones *Gdap1*-KO muestran una menor sensibilidad nociceptiva mecánica y térmica, la activación de los receptores responsables de la percepción del estímulo térmico en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO parece ser mayor, con una mayor liberación de glutamato. Por ello nos proponemos ahora estudiar otros mecanismos de señalización por calcio que puedan estar involucrados en este proceso en las neuronas DRGs, comparando a su vez estas respuestas con un modelo de neurona del SNC (las neuronas granulares de cerebelo). En principio el cerebelo no está afectado en la enfermedad humana de CMT aunque el ratón *Gdap1*-KO muestra señales de disfunción celular en esa región particular del cerebro (Barneo-Munoz et al., 2015). Además el cerebelo posee altos niveles de GDAP1 (Niemann et al., 2005) por lo que resulta un buen control en el estudio del modelo murino de la enfermedad de CMT asociada a *Gdap1*.

2.2.1 Las neuronas DRGs y las neuronas cerebelares procedentes de ratones *Gdap1*-KO muestran una menor actividad SOCE

En primer lugar hemos estudiado un mecanismo de señalización por calcio conocido como entrada de calcio operada por depósito o SOCE. La entrada de calcio operada por depósito es un mecanismo de entrada de Ca^{2+} que se activa tras la descarga de los depósitos de Ca^{2+} del RE. Diversos estudios han demostrado que la disminución de los niveles de GDAP1 (*GDAP1*-knockdown, *GDAP1*-KD) en células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y produce un defecto en el SOCE. Además el SOCE está regulado por la mitocondria en diferentes tipos celulares, puesto que el tamponamiento de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ por parte de la mitocondria a través del uniportador de calcio mitocondrial (MCU) regula tanto la activación de STIM1 como el mantenimiento del SOCE al prevenir su inactivación dependiente de Ca^{2+} . Las células *GDAP1*-KD (Pla-Martin et al., 2013) y las motoneuronas provenientes de ratones *Gdap1*-KO (Barneo-Munoz et al., 2015) tienen una actividad SOCE reducida. En las células *GDAP1*-KD la menor actividad SOCE está asociada a una reducción en la entrada de Ca^{2+} a la mitocondria debida al SOCE. Este fallo no se debe a un defecto intrínseco del tamponamiento de calcio por parte de la mitocondria, sino a una localización defectuosa de la mitocondria hacia regiones subplasmalema cercanas. Por lo tanto, la reducción en la actividad SOCE en las células *GDAP1*-KD se atribuye a la inactivación inducida por Ca^{2+} del SOCE debido a la falta de tamponamiento de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ por las mitocondrias cercanas (Pla-Martin et al., 2013, Gonzalez-Sanchez et al., 2017).

La figura 5 muestra que la activación del mecanismo SOCE es menor en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO (Fig. 5B) respecto a las WT (Fig. 5A). La entrada de Ca^{2+} asociada a la activación del mecanismo SOCE se midió como la señal de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ que se produce tras la salida de Ca^{2+} del RE activada por tapsigargina. La tapsigargina aumenta la concentración de calcio intracelular en el citosol bloqueando la capacidad de la célula de bombear calcio hacia el interior de los retículos sarcoplásmico y endoplásmico. De esta manera hemos comprobado que la activación del SOCE es menor en las neuronas *Gdap1*-KO, como muestra el análisis de diferentes parámetros: valor máximo del SOCE, 1.75 ± 0.02 en las neuronas DRGs WT frente a 1.61 ± 0.01 en las *Gdap1*-KO, y área bajo la curva SOCE, 1.66 ± 0.02 en las neuronas DRGs WT frente a 1.48 ± 0.01 en las *Gdap1*-KO (Fig. 5E). La deficiencia en GDAP1 también resulta en una disminución en el número de neuronas que muestran un aumento en el $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en respuesta al SOCE: un $99.60 \pm 0.40\%$ en las neuronas DRGs WT, frente a un $91.54 \pm 3.40\%$ en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO (Fig. 5C). Mientras que las neuronas DRGs obtenidas de

ratones heterocigotos (*Gdap1*-(+/-)) muestran un número intermedio de neuronas respondedoras a la activación del SOCE, $96.43 \pm 2.35\%$ (Fig. 5C).

Al contrario de lo que sucede con el mecanismo SOCE, la deficiencia en GDAP1 resulta en un mayor número de neuronas que muestran un aumento en el $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en respuesta a alto K^{+} : un $14.54 \pm 8.04\%$ en las neuronas DRGs WT, un $61.09 \pm 7.86\%$ en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO (Fig. 5D). De nuevo, las neuronas DRGs *Gdap1*-(+/-) muestran un valor intermedio, $25.31 \pm 5.27\%$ (Fig. 5D). Además, la entrada de calcio en respuesta a la despolarización causada por la adición de alto K^{+} también difiere entre genotipos. Estas señales son menores que las obtenidas por la activación del SOCE tanto en las neuronas WT (Fig. 5A) como en las *Gdap1*-KO (Fig. 5B); sin embargo, al contrario que con las “señales SOCE”, las “señales por K^{+} ” son mayores en las neuronas *Gdap1*-KO. Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO tienen una mayor entrada de calcio en respuesta a la despolarización causada por la adición de alto K^{+} medida como: valor máximo del pico KCl, 1.57 ± 0.02 en las neuronas DRGs WT frente a 1.72 ± 0.01 en las *Gdap1*-KO, y área bajo la curva KCl, 1.42 ± 0.01 en las neuronas DRGs WT frente a 1.47 ± 0.01 en las *Gdap1*-KO (Fig. 5F).

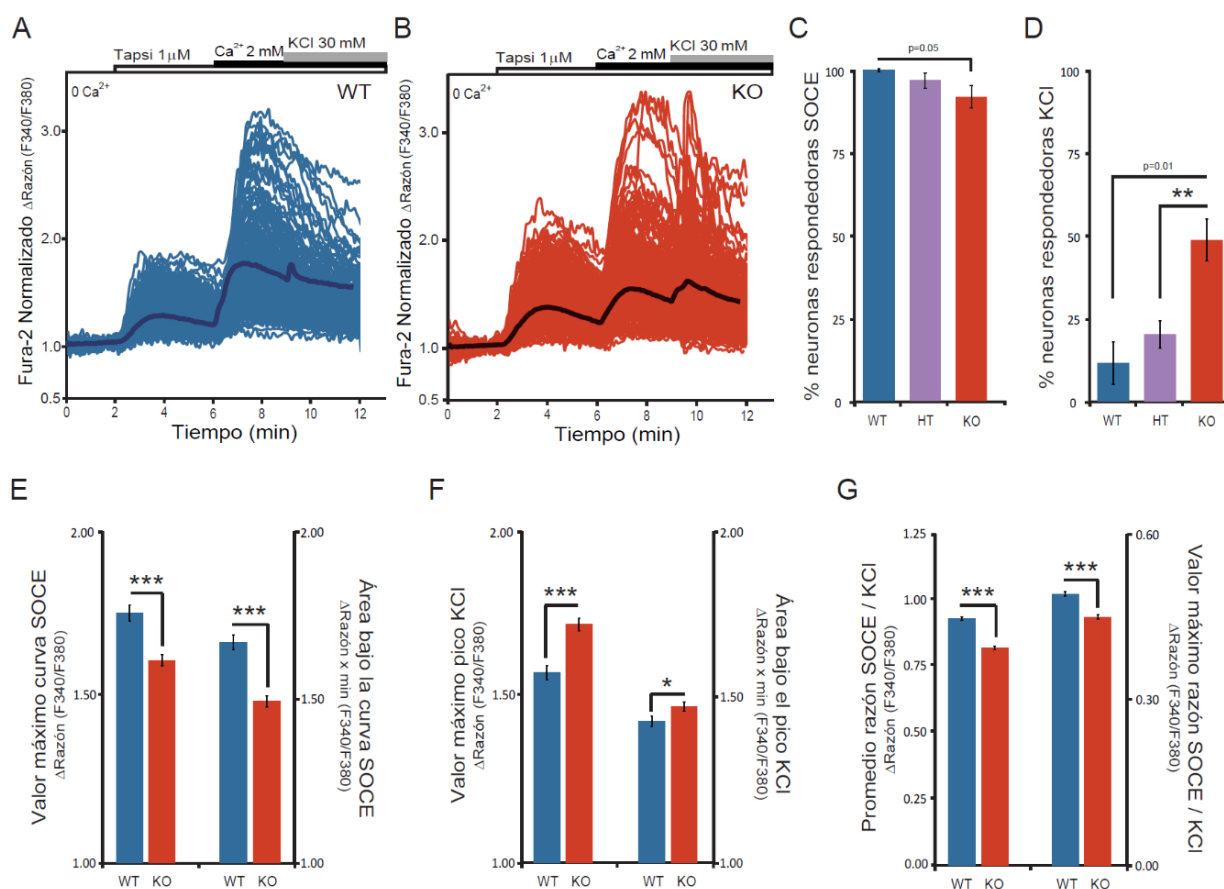


FIGURA 5. Las neuronas DRGs procedentes de ratones *Gdap1*-KO muestran una menor actividad SOCE.

Determinación de las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en el soma de neuronas DRGs. La actividad del mecanismo SOCE se

determinó como el incremento en la señal debida a la adición de calcio extracelular (CaCl_2 mM), tras el tratamiento durante 4 min con tapsigargina 1 μM en un medio libre de Ca^{2+} . La magnitud de la respuesta SOCE se comparó con la respuesta a la estimulación con KCl 30 mM. **(A, B)** Experimentos representativos en neuronas DRGs respondedoras SOCE WT **(A)** y *Gdap1*-KO **(B)**. **(C)** Porcentaje de neuronas respondedoras SOCE para cada genotipo. **(D)** Porcentaje de neuronas respondedoras a KCl para cada genotipo. **(E)** Cuantificación de la actividad SOCE como valor máximo y área bajo la curva SOCE. **(F)** Cuantificación de la respuesta a KCl como valor máximo y área bajo el pico KCl. **(G)** Análisis de la relación entre la respuesta SOCE y la respuesta KCl como promedio y valor máximo de la razón SOCE/KCl. Se analizaron más de 240 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.

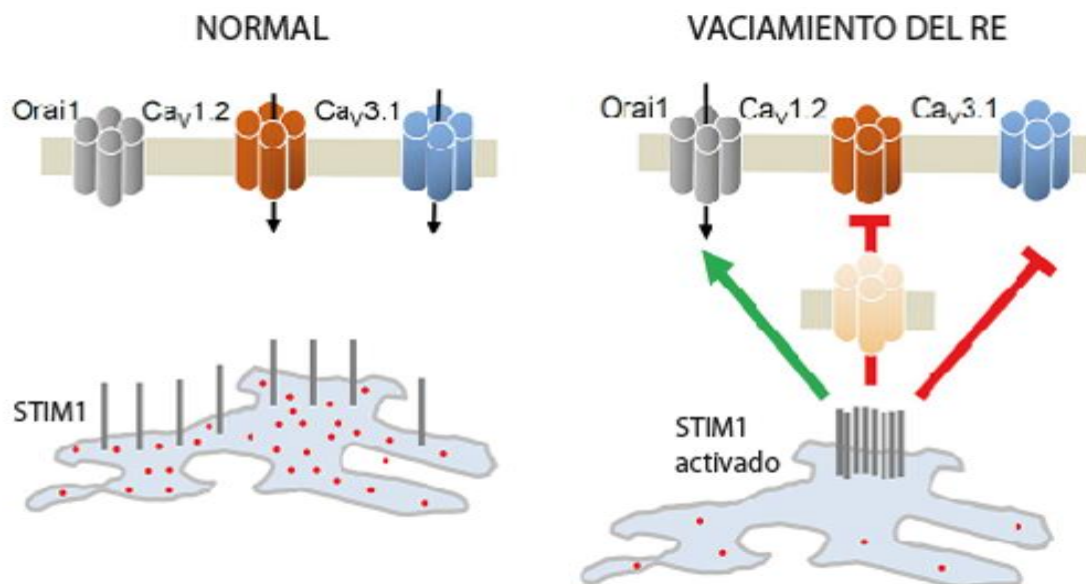
Igual que sucede con las neuronas DRGs, la activación del mecanismo SOCE es también menor en las neuronas cerebelares *Gdap1*-KO (Fig. 6B) respecto a las WT (Fig. 6A). En estos experimentos hemos utilizado el carbacol como agonista de receptores de IP_3 para producir la salida de Ca^{2+} del RE, en un medio libre de Ca^{2+} , seguida por la adición de Ca^{2+} al medio extracelular para medir las señales asociadas a la activación del mecanismo SOCE. Estas señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ son menores en las neuronas *Gdap1*-KO, como muestra el análisis de diferentes parámetros del mecanismo SOCE, como el valor máximo y el área bajo la curva, (Fig. 6E). La deficiencia en GDAP1 también resulta en una disminución en el número de neuronas que muestran un aumento en el $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en respuesta al SOCE (Fig. 6C), mientras que las neuronas cerebelares obtenidas de ratones heterocigotos (*Gdap1*-(+/-)) muestran un número intermedio (Fig. 6C).

La entrada de calcio en respuesta a la despolarización causada por la adición de alto K^+ también difiere entre genotipos, como ocurre en DRGs. Al contrario de lo que sucedía con el mecanismo SOCE, la deficiencia en GDAP1 resulta en un mayor número de neuronas que muestran un aumento en el $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en respuesta a alto K^+ (Fig. 6D). De nuevo, las neuronas cerebelares *Gdap1*-(+/-) muestran un valor intermedio (Fig. 6D). Las neuronas cerebelares *Gdap1*-KO también tienen una mayor entrada de calcio en respuesta a la despolarización causada por la adición de alto K^+ medida como (Fig. 6F).

Por lo tanto, igual que sucedía con las células *GDAP1*-KD (Pla-Martin et al., 2013) y con las motoneuronas provenientes de ratones *Gdap1*-KO (Barneo-Munoz et al., 2015), la ausencia de GDAP1 causa una menor activación del SOCE tanto en neuronas DRGs como en neuronas cerebelares. En el caso de estas neuronas, esto también se traduce en cambios en la respuesta de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs), como muestra la respuesta a la despolarización causada por la adición de alto K^+ . Esto es muy significativo porque la

activación de canales dependientes de voltaje es una propiedad de las neuronas que no podíamos estudiar en las células de neuroblastoma, y se ha podido estudiar de forma comparativa con la actividad SOCE.

Diversos estudios han demostrado la relación entre STIM1 y varios subtipos de VGCCs (Harraz and Altier, 2014, Park et al., 2010, Wang et al., 2010). Además de su papel como sensor de Ca^{2+} del RE y su interacción con Orai1 y otros para formar el canal SOCE, STIM1 interacciona de manera inhibitoria con los canales $\text{Ca}_v1.2$ (un subtipo de canal VGCC tipo L) (Wang et al., 2010, Park et al., 2010) y $\text{Ca}_v3.1$ (un subtipo de canal VGCC tipo T) (Nguyen et al., 2013). Así, STIM1 libre de calcio activaría el mecanismo SOCE mientras que inhibiría la activación de los VGCCs, y una mayor actividad del mecanismo SOCE, implicaría una reducción en la activación de los VGCCs, tal y como vemos en nuestros resultados (ver esquema 1).



ESQUEMA 1. Regulación de los VGCC mediada por STIM1. En condiciones basales, los dominios mano-EF de STIM1 están ocupados por Ca^{2+} . Tras el vaciamiento del retículo endoplásmico, las moléculas de STIM1 agregan en regiones próximas a la membrana plasmática para activar a los canales Orai pero inhibiendo a los canales $\text{Ca}_v1.2$ (tipo-L) y $\text{Ca}_v3.1$ (tipo-T). La internalización de $\text{Ca}_v1.2$ inducida por STIM1 elimina a los canales funcionales de la superficie de la célula. Modificado de Harraz y Altier (*Frontiers in Cell Neurosci.*, 2014) (Harraz and Altier, 2014).

En las neuronas DRGs, el análisis de la razón SOCE/KCl muestra que la razón es 0.93 ± 0.00 en las neuronas DRGs WT frente a 0.82 ± 0.00 en las *Gdap1*-KO, asimismo el valor

máximo de la razón es 0.49 ± 0.00 en las neuronas DRGs WT frente a 0.45 ± 0.00 en las *Gdap1*-KO (Fig. 5G).

De la misma manera, en las neuronas cerebelares el análisis de la razón SOCE/KCl muestra que la razón es 1.00 ± 0.01 en las neuronas cerebelares WT frente a 0.77 ± 0.00 en las *Gdap1*-KO, asimismo el valor máximo de la razón es 0.69 ± 0.01 en las neuronas cerebelares WT frente a 0.63 ± 0.00 en las *Gdap1*-KO (Fig. 6G).

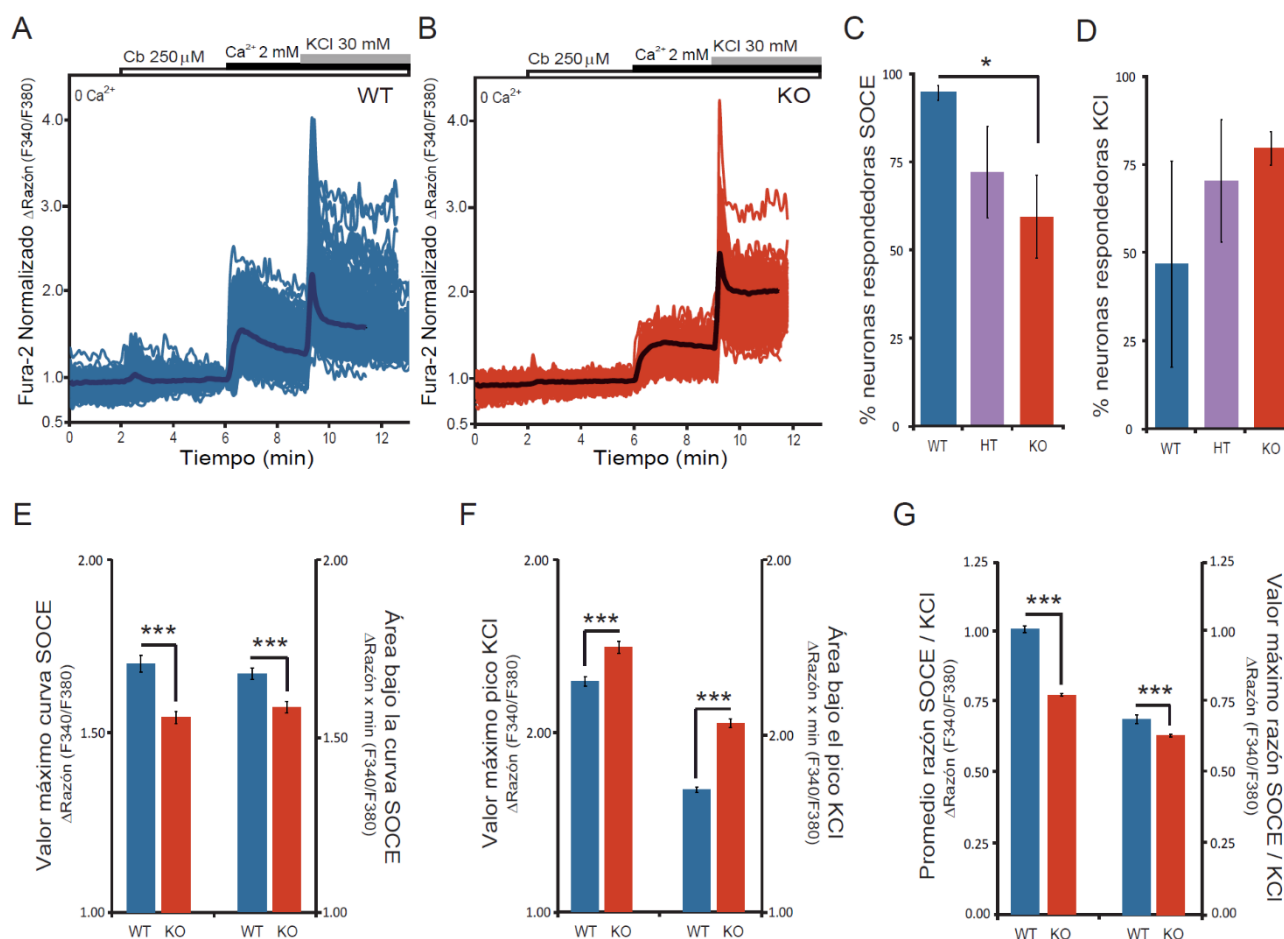


FIGURA 6. Las neuronas cerebelares procedentes de ratones *Gdap1*-KO muestran una menor actividad SOCE. Determinación de las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en el soma de neuronas granulares de cerebelo. (A, B) Experimentos representativos en neuronas cerebelares respondedoras SOCE *Gdap1*-WT (A) y *Gdap1*-KO (B). (C) Porcentaje de neuronas respondedoras SOCE para cada genotipo. (D) Porcentaje de neuronas respondedoras a KCl para cada genotipo. (E) Cuantificación de la actividad SOCE como valor máximo y área bajo la curva SOCE. (F) Cuantificación de la respuesta a KCl como valor máximo y área bajo el pico KCl. (G) Análisis de la relación entre la respuesta SOCE y la respuesta KCl como promedio y valor máximo de la razón SOCE/KCl. Se analizaron más de 180 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.

2.2.2 Las neuronas DRGs procedentes de ratones *Gdap1*-KO muestran una menor actividad basal de los VGCCs

Los resultados previos demuestran que en ausencia de GDAP1 hay un mayor número de neuronas DRGs que muestran un aumento en el $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en respuesta a la despolarización causada por la adición de alto K^{+} tras la activación del mecanismo SOCE (Fig. 5D y 6D). Esto podría deberse al mecanismo de reciprocidad de STIM1, es decir, STIM1 libre de calcio activaría el mecanismo SOCE mientras que inhibiría la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs). En nuestro caso, la menor actividad del mecanismo SOCE en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO implicaría una mayor activación de los VGCCs, tal y como vemos en nuestros resultados (Fig. 5F y 6F). Este efecto que la ausencia de GDAP1 produce sobre los VGCCs parece estar específicamente causado por la actividad del mecanismo SOCE, puesto que en estado basal, sin la activación previa del mecanismo SOCE, las neuronas DRGs *Gdap1*-KO muestran menor actividad de los VGCCs (Fig. 7B) respecto a las neuronas WT (Fig. 7A). Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO tienen una menor entrada de calcio en respuesta a la despolarización causada por la adición de alto K^{+} (Fig. 7D). En cuanto al porcentaje de neuronas que responden a KCl, no se observan variaciones entre genotipos (Fig. 7C). Esto contrasta con los resultados previos en los que el número de neuronas respondedoras a KCl tras la activación del SOCE disminuía significativamente en el caso de las neuronas DRGs WT (Fig. 5D).

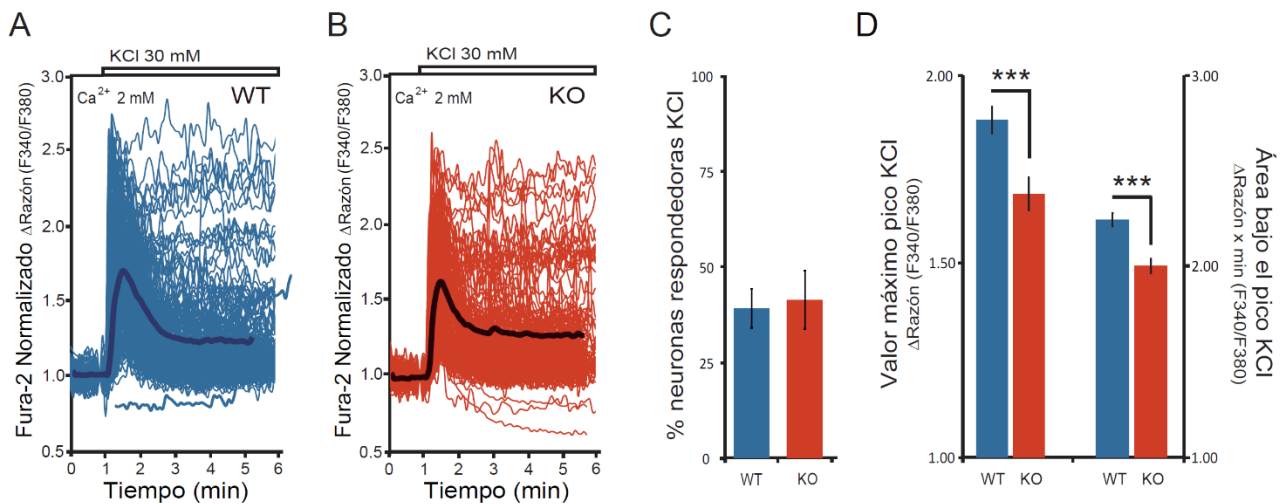


FIGURA 7. Las neuronas DRGs procedentes de ratones *Gdap1*-KO muestran una menor actividad basal de los VGCCs. Determinación de las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en el soma de neuronas DRGs. La actividad de los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs) se determinó como el incremento en la señal debida a la adición de alto potasio (KCl 30 mM) en un medio con Ca^{2+} 2 mM. **(A, B)** Experimentos representativos en neuronas DRGs respondedoras a KCl WT **(A)** y *Gdap1*-KO **(B)**. **(C)** Porcentaje de neuronas respondedoras a KCl para cada genotipo. **(D)** Cuantificación de la respuesta a KCl como valor máximo y área bajo el pico KCl. Se analizaron al

menos 75 células de 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.

2.2.3 Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas DRGs y neuronas cerebelares

Actualmente existe un amplio abanico de inhibidores con mayor o menor especificidad sobre los distintos componentes del canal SOCE. A continuación la tabla 1, basada en la detallada revisión de Prakriya y Lewis (2015) (Prakriya and Lewis, 2015), resume los inhibidores existentes y sus modos de acción.

Con objeto de estudiar en más detalle cuál es el mecanismo responsable de la menor activación del SOCE en ausencia de GDAP1, hemos utilizando dos de los inhibidores considerados más específicos, 2-APB e YM-58483, analizando su efecto sobre el propio mecanismo SOCE y las consecuencias que esto tiene en relación a la actividad de los VGCCs.

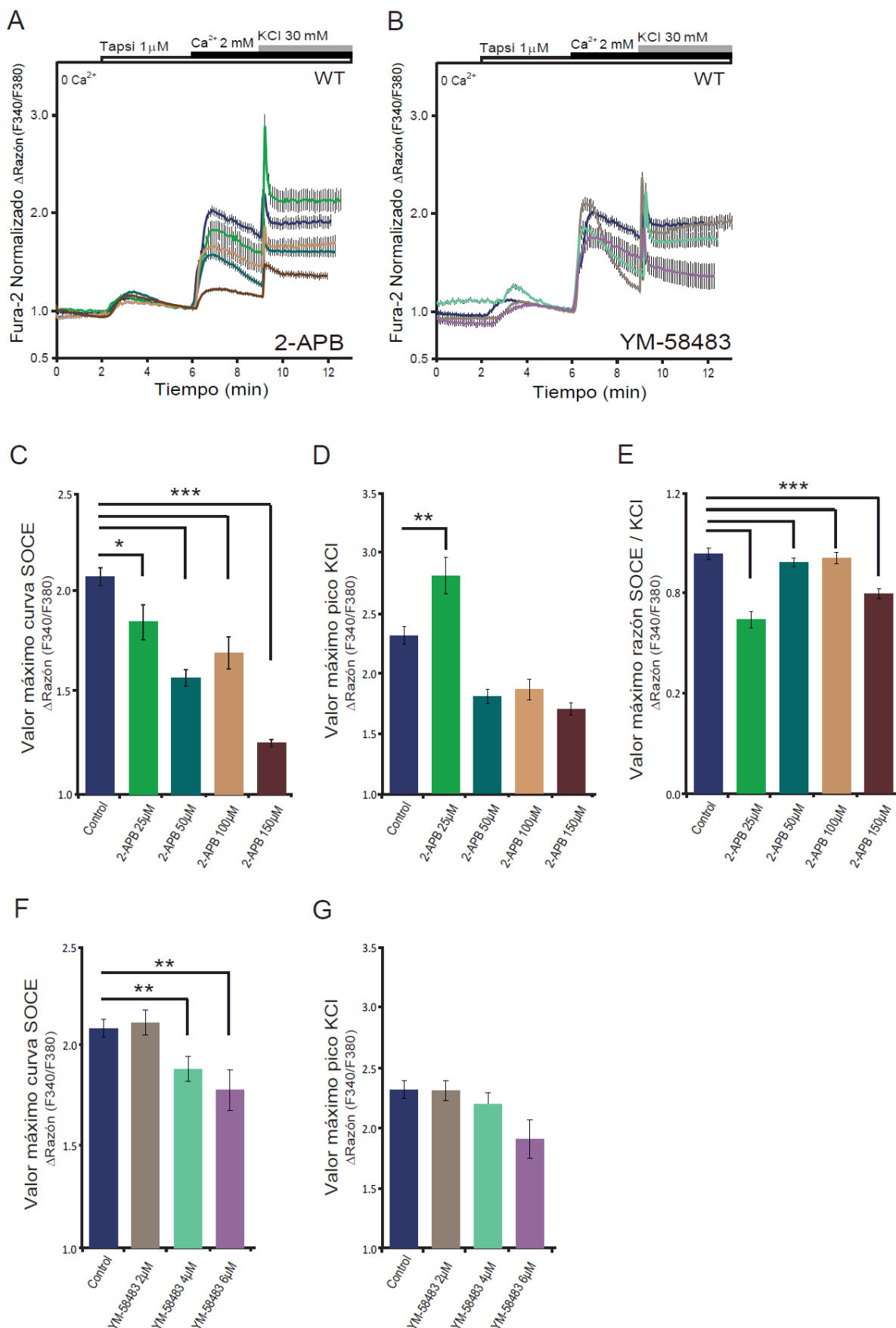
Compuesto	Efecto	Mecanismo	IC ₅₀
La ³⁺	Inhibición	Bloqueo del poro	20 nM (SOCE) 33-58 nM, $n_H = 1.5$ (SOCE) 240 nM, $n_H = 1.0$ (Orai1) 470 nM, $n_H = 1.1$ (Orai3)
Gd ³⁺	Inhibición	Bloqueo del poro	18-28 nM, $n_H = 1.5-2$ (SOCE) 46 nM, $n_H = 1.0$ (I_{CRAC} , células S2)
2-APB *	Aumento de la corriente activada por STIM1	Desconocido	3 μ M, $n_H = 4$ (I_{CRAC}) 4 μ M, $n_H = 3$ (Orai1)
2-APB *	Inhibición	Desconocido	10 μ M, $n_H = 4$ (I_{CRAC}) 8 μ M, $n_H = 3$ (Orai1)
2-APB *	Activación	Activación directa del canal?	24 μ M, $n_H = 8$ (Orai3, I_{CRAC}) 15 μ M, $n_H = 2$ (Orai3, SOCE)

Análogos de 2-APB (DPB162-AE y DPB163-AE)	Inhibición	Desconocido	90-170 nM, $n_H = 4$ (I_{CRAC})
ML-9	Inhibición	Inhibe la translocación de STIM1	16 μ M (SOCE)
BTP2 (YM58483) *	Inhibición	Desconocido	100-150 nM (SOCE; agudo) 6-12 nM (SOCE; 24h preincub.) 0.5-2.2 μ M (I_{CRAC} ; agudo)
Synta66	Inhibición	Desconocido	3 μ M (I_{CRAC})
Econazole	Inhibición	Desconocido	0.6-14 μ M (I_{CRAC})
SK&F96365	Inhibición	Desconocido	4 μ M (I_{CRAC})
GK-7975A GSK- 5503A	Inhibición	Desconocido	4 μ M (Orai1)
R02959	Inhibición	Desconocido	25 nM (Orai1) 530 nM (Orai3)
AnCoA4	Inhibición	Inhibe Orai1	1-10 μ M (Orai1)
m2C1.1 (anticuerpo monoclonal, mAb)	Inhibición	Inhibe Orai1	1 nM (Orai1)
Anti-Orai1 mAb	Inhibición	Inhibe la función de Orai1 (por endocitosis?)	< 1 nM (SOCE)

TABLA 1. Farmacología de los canales CRAC. Se indica cuando la actividad inhibitoria fue medida de la corriente CRAC endógena (I_{CRAC}) o SOCE, o a partir de corrientes heterólogas (Orai1, 2, y 3). Los compuestos marcados con un asterisco (*) son los que se han utilizado en los experimentos con neuronas DRGs o neuronas granulares de cerebelo. Modificado de Prakriya y Lewis (*Physiol Rev.*, 2015) (Prakriya and Lewis, 2015).

El 2-APB es un antagonista no competitivo de los receptores IP_3 (Maruyama et al., 1997) y se utiliza ampliamente como inhibidor del SOCE/ I_{CRAC} . Su mecanismo de acción no está claro, no obstante, lo que sí han determinado diversos estudios es un efecto bimodal dependiente de dosis, con una fuerte estimulación de la corriente I_{CRAC} y del SOCE a bajas concentraciones (<5 μ M) y un aumento transitorio seguido de una inhibición a altas concentraciones (>20 μ M).

El compuesto es relativamente no selectivo, y activa o inhibe muchas clases de canales iónicos y receptores, incluidos los IP_3 Rs (por lo que inhibiría en parte la salida de Ca^{2+} del RE), los canales TRPC, TRPM y TRPV, y la entrada mitocondrial de Ca^{2+} .



(página anterior) **FIGURA 8. Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas DRGs *Gdap1*-WT.** Determinación de las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en el soma de neuronas DRGs *Gdap1*-WT. La actividad del mecanismo SOCE se determinó como en experimentos anteriores, añadiendo en este caso al inicio del experimento el inhibidor 2-APB o YM-58483, a la concentración indicada. **(A, B)** Comparación del efecto de diferentes dosis de los inhibidores 2-APB **(A)** e YM-58483 **(B)**. **(C-E)** Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de 2-APB testadas sobre la actividad SOCE **(C)**, la respuesta a KCl **(D)** y la relación razón SOCE/KCl **(E)**, medido como valor máximo. **(F-H)** Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de YM-58483 testadas sobre la actividad SOCE **(F)** y la respuesta a KCl **(G)**, medido como valor máximo. Se analizaron más de 100 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.

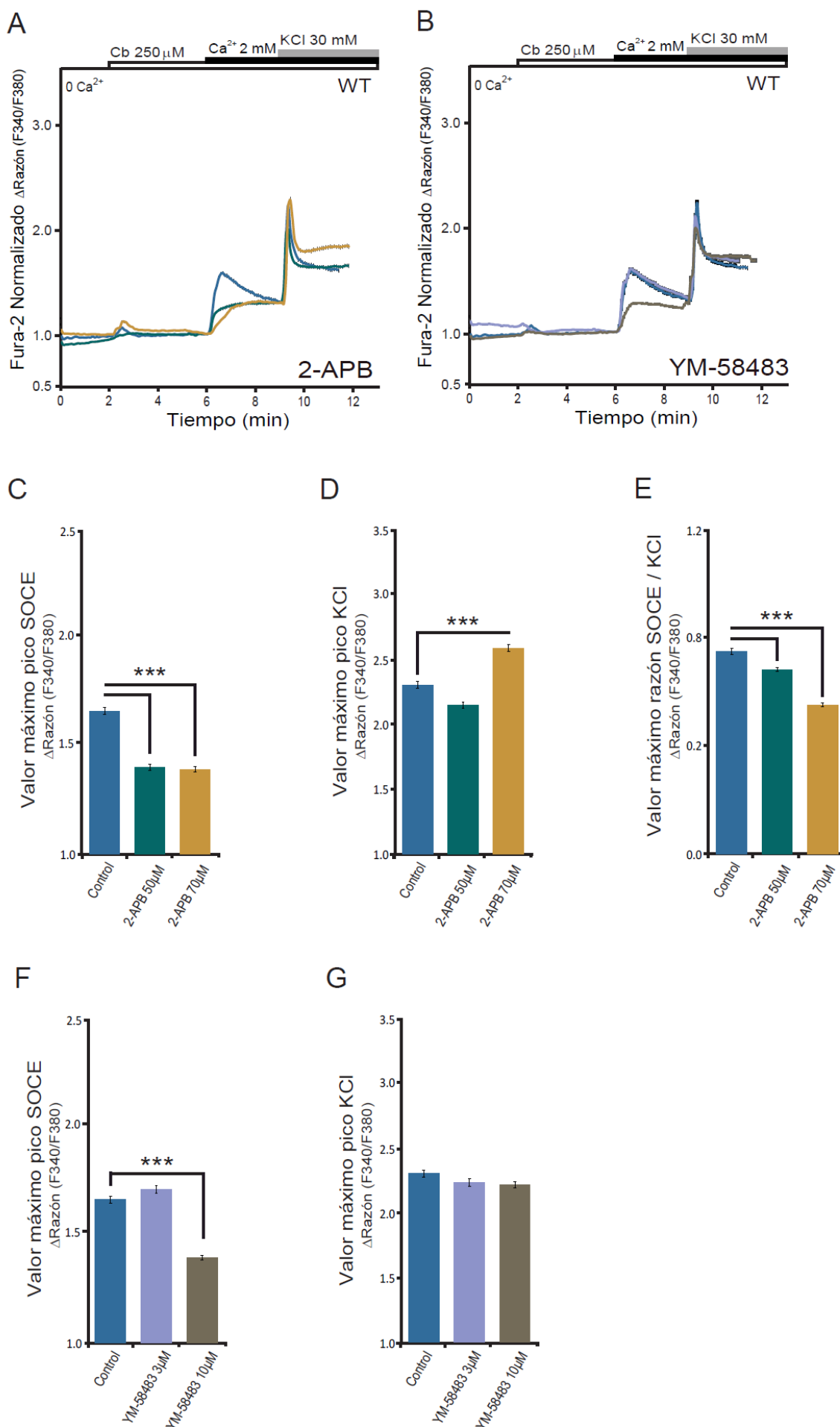
Otra clase de agentes que inhiben la actividad del canal CRAC son los bis(trifluorometil)pirazoles (BTPs) que potencialmente inhiben la liberación de citoquinas por parte de linfocitos humanos y suprimen la proliferación de células T.

El miembro de este grupo mejor estudiado es el compuesto BTP2 (también conocido como YM-58483), que inhibe la entrada de Ca^{2+} inducida por taspigargina y la corriente I_{CRAC} en células Jurkat T (Trevillyan et al., 2001, Ishikawa et al., 2003, Chen et al., 2002). Este inhibidor es considerado más específico del SOCE porque no tiene efecto sobre los VGCCs. El mecanismo preciso por el que el compuesto inhibe el flujo de Ca^{2+} no se comprende completamente, aunque parece actuar sobre los canales TRPC en la membrana plasmática reduciendo la probabilidad de apertura del canal SOCE más que inhibiendo las propiedades del poro (He et al., 2005). Si se ha establecido que su efectividad varía según la concentración de uso y el modo de aplicación.

En el caso del compuesto 2-APB, hemos testado un rango de concentraciones desde 25 hasta 150 μM en neuronas DRGs (Fig. 8A) y dos concentraciones intermedias en las neuronas cerebelares (50 y 70 μM , Fig. 9A).

En las neuronas DRGs WT se observa una disminución significativa de la entrada de Ca^{2+} asociada al SOCE con todas las concentraciones de 2-APB testadas. Esta inhibición es dependiente de dosis, excepto en el caso de la concentración de 100 μM : 10.91%, 24.31%, 18.24% y 39.88% para las concentraciones de 25, 50, 100 y 150 μM , respectivamente (Fig. 8C). Esta inhibición de la actividad del SOCE tiene como consecuencia una mayor entrada de Ca^{2+} debido a la acción de los VGCCs, pero este efecto es más claro sólo a la menor concentración de uso, 25 μM : se observa una estimulación de la acción de los VGCCs de un 21.56% (Fig. 8D). Sin embargo, la razón SOCE/KCl si disminuye para todas las

concentraciones testadas: 27.52%, 3.61%, 1.70% y 16.69% para 25, 50, 100 y 150 μM , respectivamente (Fig. 8E).



(página anterior) **FIGURA 9. Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas cerebelares *Gdap1*-WT.** Determinación de las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en el soma de neuronas cerebelares *Gdap1*-WT. La actividad del mecanismo SOCE se determinó como en experimentos anteriores, añadiendo en este caso al inicio del experimento el inhibidor correspondiente a la concentración indicada. (A-B) Comparación del efecto de diferentes dosis de los inhibidores 2-APB (A) e YM-58483 (B). (C-E) Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de 2-APB testadas sobre la actividad SOCE (C), la respuesta a KCl (D) y la relación razón SOCE/KCl (E), medido como valor máximo. (F-H) Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de YM-58483 testadas sobre la actividad SOCE (F) y la respuesta a KCl (G), medido como valor máximo. Se analizaron más de 60 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.

En las neuronas cerebelares WT se observa también una disminución significativa de la entrada de Ca^{2+} asociada al SOCE a las concentraciones de 50 y 70 μM 2-APB (Fig. 9A y 9C). De nuevo esta inhibición de la actividad del SOCE tiene como consecuencia una mayor entrada de Ca^{2+} debido a la acción de los VGCCs (Fig. 9D). Efectivamente la razón SOCE/KCl disminuye un 9.07% y un 26.52% para las concentraciones de 50 y 70 μM , respectivamente, en las neuronas (Fig. 9E).

Respecto al compuesto YM-58483 hemos testado concentraciones desde 2 hasta 10 μM (Fig. 8B y 9B). Se observa una reducción del SOCE en las neuronas DRGs WT sólo a las concentraciones de 4 y 6 μM , inhibición del 9.63% y 14.72% respectivamente (Fig. 8F). Sin embargo, con estas dosis no se consigue una estimulación de la actividad de los receptores VGCCs (Fig. 8G).

En las neuronas cerebelares sólo se observa un efecto inhibitorio del SOCE claro a la concentración de 10 μM , inhibición del 16.11% (Fig. 9B). Sin embargo, con esta dosis no se consigue tampoco una estimulación de la actividad de los receptores VGCCs (Fig. 9G).

En las neuronas de cerebelo se realizó un estudio más exhaustivo analizando el efecto sobre mecanismo SOCE y la relación con la actividad de los VGCCs también en neuronas *Gdap1*-KO (resultados suplementarios, Fig. S1). Además se utilizaron otros inhibidores del SOCE, aparte del 2-APB e YM-5848, considerados menos específicos: los iones trivalentes de La^{3+} y Gd^{3+} (resultados suplementarios, Fig. S2 y S3).

Por lo tanto, inhibidores del SOCE que actúan también sobre los receptores IP_3 inhibiendo la salida de Ca^{2+} del RE, como el 2-APB, promueven probablemente una menor activación de STIM1 y por consiguiente menor SOCE y mayor actividad de los VGCCs, algo que no ocurre con YM-58483, que no actúa sobre los receptores IP_3 . En nuestros resultados, un menor SOCE

en las neuronas *Gdap1*-KO (tanto DRGs como cerebelares) se corresponde con una menor actividad de los VGCCs, esto sugiere que el fallo se debe, al menos en parte, a una menor movilización de Ca^{2+} del RE y tal vez una menor activación de STIM1.

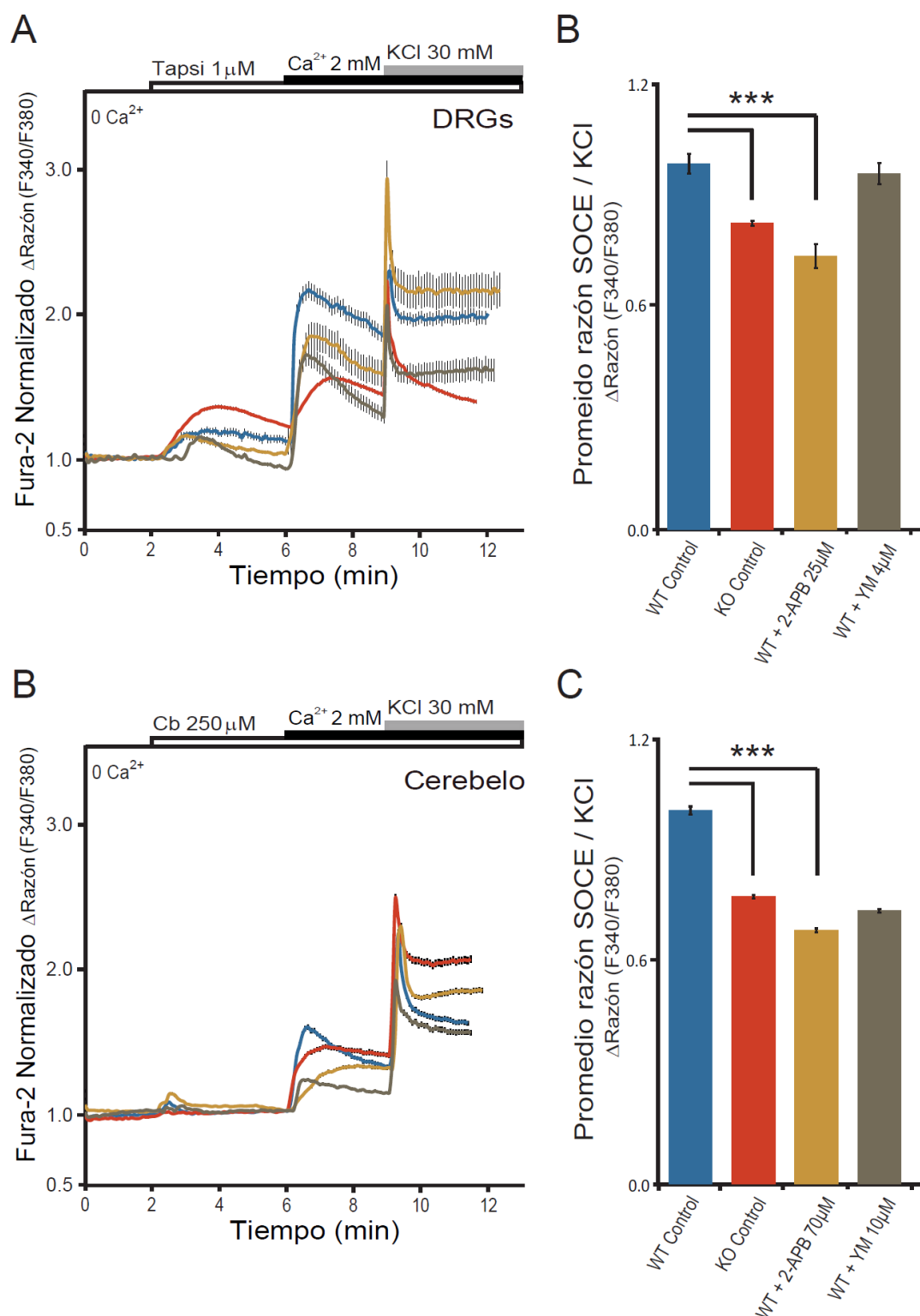


FIGURA 10. El tratamiento de neuronas WT con los inhibidores SOCE reproduce la reducción en la actividad del mecanismo que las neuronas *Gdap1*-KO presentan en condiciones basales. Determinación de

las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en el soma de neuronas WT y *Gdap1*-KO. La actividad del mecanismo SOCE se determinó como en experimentos anteriores, añadiendo en este caso al inicio del experimento el inhibidor correspondiente a la concentración indicada. (A, C) Comparación del mecanismo SOCE en situación basal en neuronas DRGs (A) y neuronas cerebelares (C) WT y *Gdap1*-KO, respecto al efecto de diferentes inhibidores SOCE sobre neuronas WT. (B, D) Cuantificación de la relación razón SOCE / KCl, medida como valor máximo, en las diferentes condiciones testadas en neuronas DRGs (B) y neuronas cerebelares (D). Se analizaron más de 60 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.

La Figura 10 resume el efecto de las concentraciones óptimas de 2-APB y YM sobre neuronas DRG y cerebelares mostrando como 2-APB reproduce la reducción en la actividad del SOCE y la estimulación de los receptores VGCCs que las neuronas *Gdap1*-KO. Como se tratará en la discusión, resultados obtenidos por Paloma González Sánchez indican que, a diferencia de neuroblastoma, la captura de calcio por la mitocondria no tiene influencia sobre el SOCE neuronal (Gonzalez-Sanchez, 2017). Por lo tanto, la menor actividad SOCE en las neuronas *Gdap1*-KO no puede asociarse a una mala localización de las mitocondrias KO, y podría deberse a una menor salida de Ca^{2+} del RE. Por lo tanto, se ha examinado el contenido de Ca^{2+} del RE en estas neuronas.

2.2.4 Las neuronas DRGs y cerebelares *Gdap1*-KO tienen menores niveles de calcio del retículo endoplásmico

Una de las funciones que se han atribuido al mecanismo SOCE es la del llenado de Ca^{2+} del RE (Hartmann et al., 2014, Samtleben et al., 2015). El mantenimiento de los niveles de calcio es crítico para el correcto funcionamiento del RE. El plegamiento proteico, principal función del RE, está regulado por proteínas sensibles a Ca^{2+} de manera que concentraciones bajas de Ca^{2+} dentro del orgánulo causan la activación de la “respuesta a proteínas mal plegadas” (UPR, *Unfolded Protein Response*) para restaurar la función celular normal o incluso causar eventualmente la muerte celular (Senft and Ronai, 2015). Para evaluar si la reducción en la actividad SOCE está afectando a los niveles de Ca^{2+} del RE hemos evaluado las señales de Ca^{2+} producidas al descargar el Ca^{2+} del RE usando el ionóforo Br-A23187, en un medio libre de Ca^{2+} . Como muestran las figuras 11A y 11B las neuronas DRGs *Gdap1*-KO poseen menores niveles de Ca^{2+} en el RE respecto a las WT, medidos como valor máximo del pico de calcio, 2.67 ± 0.03 en las neuronas DRGs WT frente a 2.42 ± 0.03 en las *Gdap1*-KO, y área bajo la curva, 1.91 ± 0.04 en las neuronas DRGs WT frente a 1.49 ± 0.03 en las *Gdap1*-KO (Fig. 11C).

En cuanto a las neuronas cerebelares, las neuronas *Gdap1*-KO poseen también menores niveles de Ca^{2+} en el RE respecto a las WT (Fig. 11D-F).

Todo esto coincide con resultados previos obtenidos en células de neuroblastoma *GDAP1*-KD (Pla-Martin et al., 2015, Gonzalez-Sanchez et al., 2017).

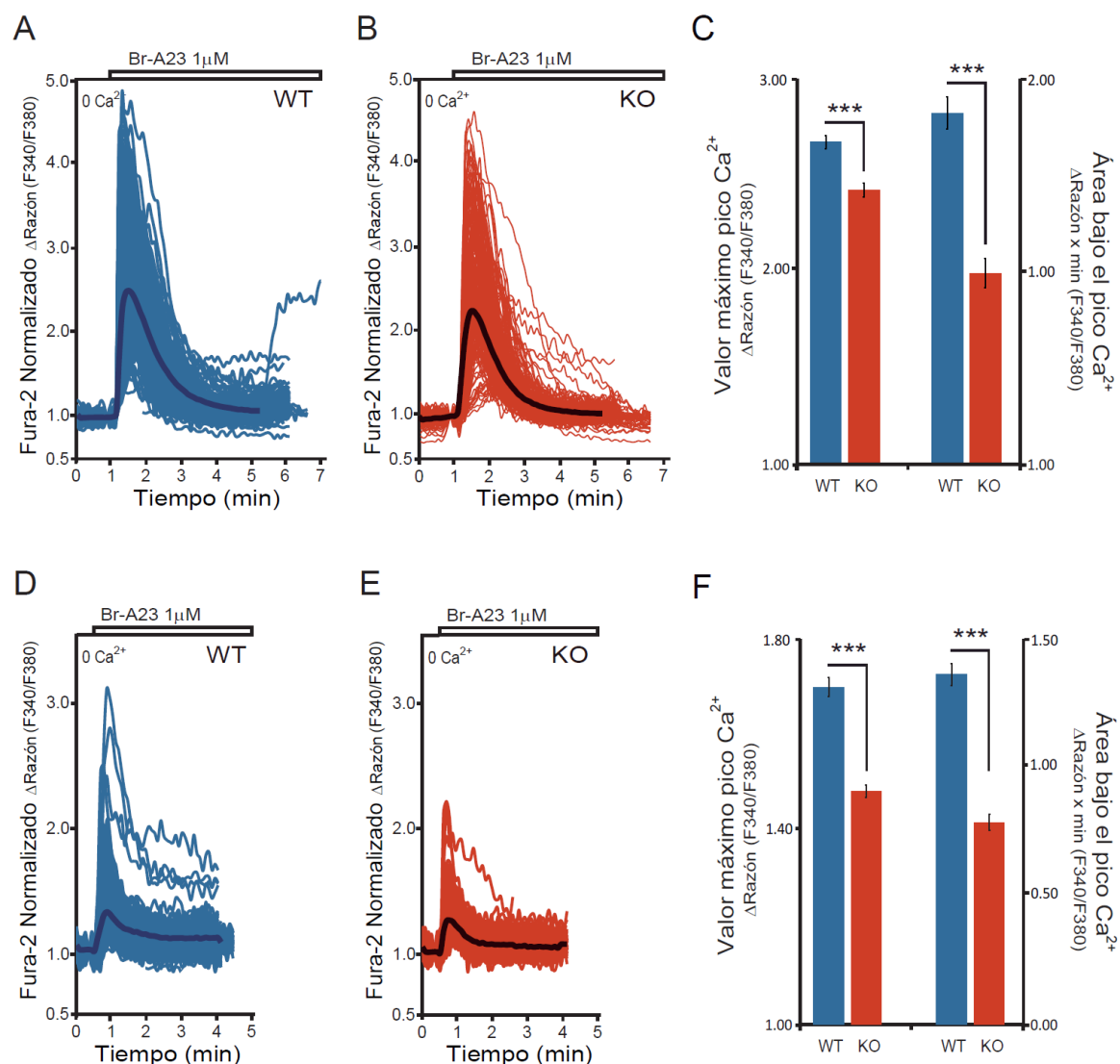


FIGURA 11. La reducción en la activación del SOCE de las neuronas DRGs y cerebelares *Gdap1*-KO se asocia con menores niveles de calcio del retículo endoplásmico. Señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en el soma de neuronas DRGs y cerebelares. Los niveles de Ca^{2+} del RE se determinaron como el incremento en la señal debida a la adición de Br-A23187 1 μM en un medio libre de Ca^{2+} . (A, B, D, E) Experimentos representativos en neuronas WT DRGs (A) y cerebelares (D), y *Gdap1*-KO DRGs (B) y cerebelares (E). (C, F) Cuantificación de los niveles de Ca^{2+} del RE como valor máximo y área bajo el pico de Ca^{2+} . Se analizaron más de 390 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.

2.2.5 La menor actividad SOCE de neuronas DRGs y cerebelares *Gdap1*-KO es especialmente relevante en las neuritas

Con el objeto de estudiar más detalladamente las consecuencias de la deficiencia en GDAP1 en la región de la membrana plasmática, hemos utilizado la sonda de calcio Lyn-D3cpv codificada genéticamente y dirigida a la membrana plasmática (Palmer et al., 2006). Utilizando esta sonda hemos podido analizar de manera independiente el comportamiento en somas celulares frente a neuritas, con idea de que un defecto en el SOCE sería más relevante en neuritas que en somas, puesto que la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth afecta a neuritas largas, comienza en los miembros distales y progresa en función de la longitud de éstos (Sevilla et al., 2008). En general las señales de calcio a través de la membrana plasmática inducidas por la activación del SOCE son muy prominentes tanto en los cuerpos celulares como en las neuritas, tanto en las neuronas DRGs WT (Fig. 12A) como en las neuronas *Gdap1*-KO (Fig. 12B), aunque la respuesta SOCE es significativamente menor en ausencia de GDAP1. La entrada de calcio a través de la

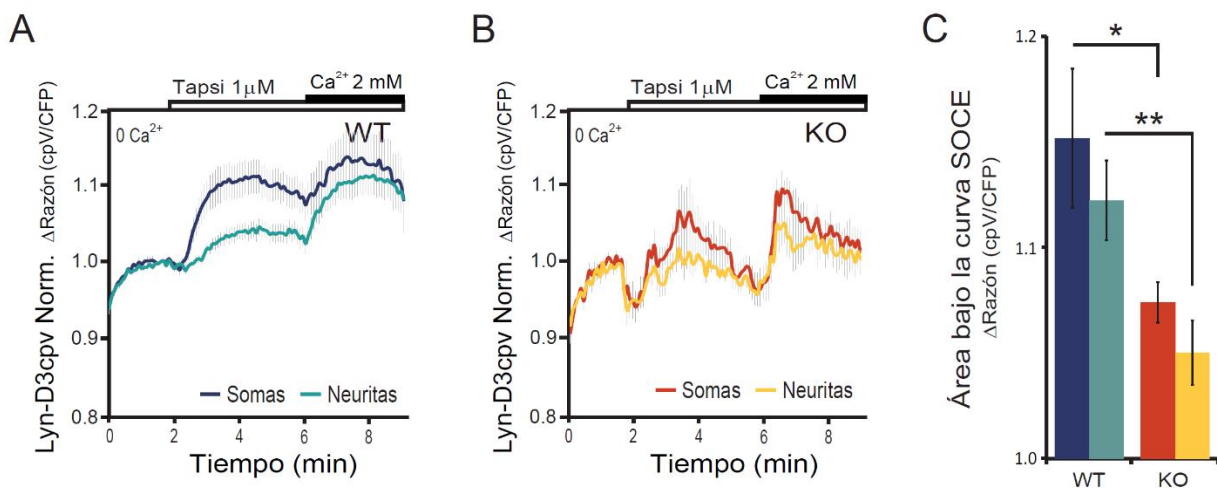


FIGURA 12. La reducción de actividad SOCE en neuronas DRGs *Gdap1*-KO es consecuencia de una menor entrada de calcio a través de la membrana plasmática, siendo el defecto especialmente relevante en las neuritas. Determinación de las señales de calcio a través de la membrana plasmática en neuronas DRGs mediante el sensor FRET Lyn-D3cpv. (A, B) Promedio de la señal Lyn-D3cpv en somas y neuritas de neuronas DRGs WT (A) y *Gdap1*-KO (B). Las señales son la media de al menos 15 células de no menos de 4 experimentos. (C) Cuantificación del área bajo la curva SOCE de somas y neuritas WT y *Gdap1*-KO. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA de dos factores (genotipo y región celular) (test post hoc Bonferroni).

Del mismo modo, en las neuronas cerebelares se han obtenido resultados equivalentes (Fig. 13).

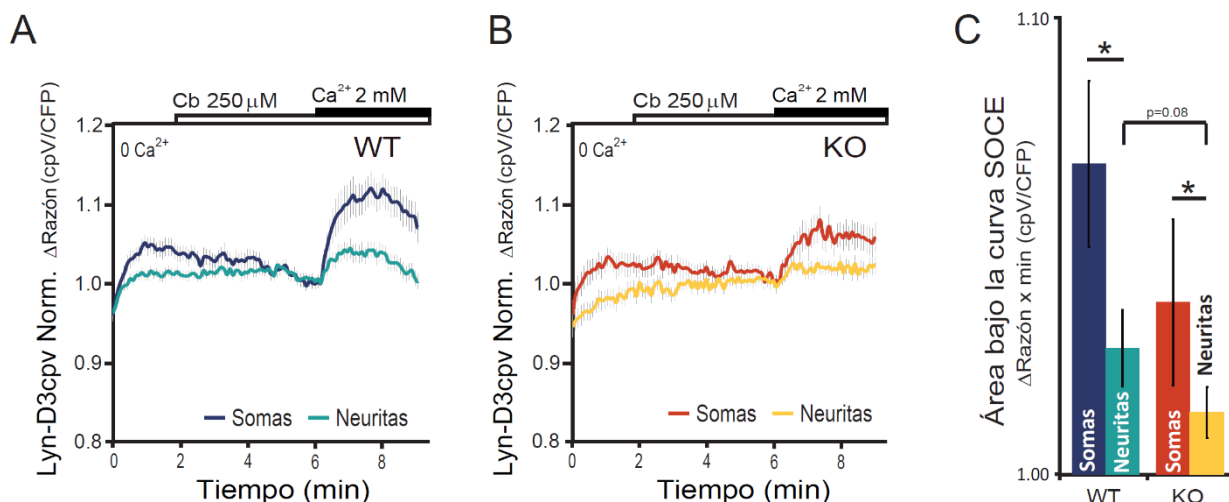


FIGURA 13. La reducción de actividad SOCE en neuronas cerebelares *Gdap1*-KO es consecuencia de una menor entrada de calcio a través de la membrana plasmática, siendo el defecto especialmente relevante en las neuritas. Determinación de las señales de calcio a través de la membrana plasmática en neuronas cerebelares mediante el sensor FRET Lyn-D3cpv. (A, B) Promedio de la señal Lyn-D3cpv en somas y neuritas de neuronas cerebelares WT (A) y *Gdap1*-KO (B). Las señales son la media de al menos 17 células de no menos de 4 experimentos. (C) Cuantificación del área bajo la curva SOCE de somas y neuritas WT y *Gdap1*-KO. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA de dos factores (genotipo y región celular) (test post hoc Bonferroni).

2.2.6 Las neuronas DRGs y las neuronas cerebelares *Gdap1*-KO muestran menor entrada de calcio a la mitocondria asociada a la menor activación del SOCE, siendo el defecto especialmente relevante en las neuritas

Aunque la captura de Ca²⁺ por la mitocondria no afecta a la actividad SOCE neuronal (P. González Sánchez, Tesis Doctoral, 2017), su señal puede alcanzar la mitocondria. Por ello el siguiente paso fue medir cambios en los niveles de Ca²⁺ mitocondrial (Ca²⁺_{mit.}) causados por la activación del SOCE utilizando la sonda 4mt-D3cpv codificada genéticamente y dirigida a la matriz mitocondrial (Palmer et al., 2006). Las figuras 14A y 14B muestran que la entrada de Ca²⁺ en la mitocondria inducida por SOCE es robusta, como muestran los picos de Ca²⁺_{mit.} generados por las señales de Ca²⁺ inducidas por la activación del mecanismo SOCE. Sin embargo, las señales de Ca²⁺_{mit.} generadas por SOCE son menores en neuronas *Gdap1*-KO respecto a las neuronas WT, siendo este efecto especialmente significativo en neuritas (Fig. 14C). Estas señales de Ca²⁺_{mit.}, medidas como área bajo la curva, fueron de 1.080 ± 0.028 y

1.055 ± 0.021 en somas y neuritas, respectivamente, de neuronas WT, y 1.028 ± 0.03 y 0.065

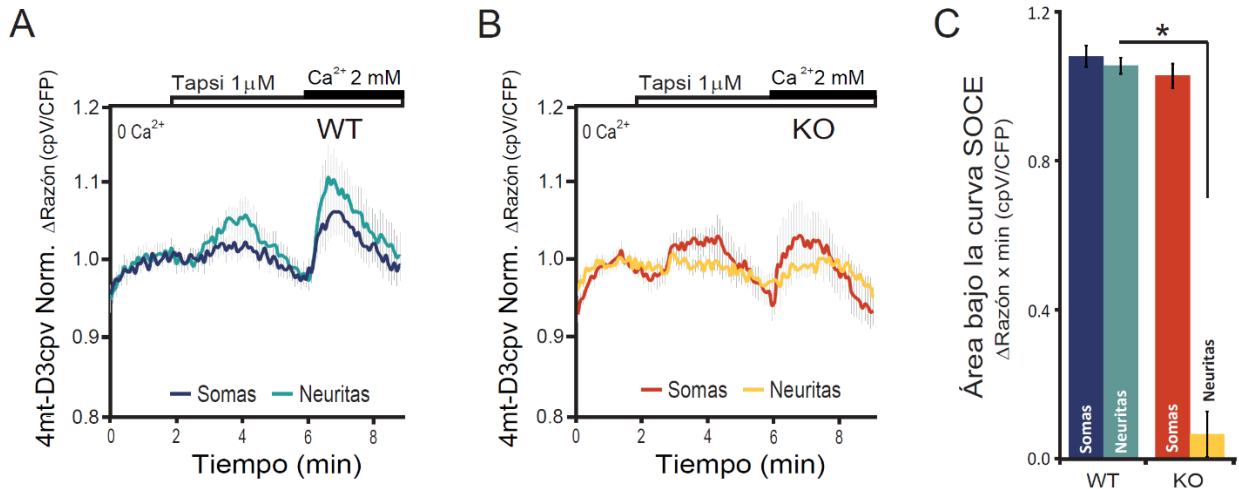


FIGURA 14. Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO muestran menor entrada de calcio a la mitocondria asociada a la menor activación del SOCE, siendo el defecto especialmente relevante en las neuritas. Determinación de las señales de calcio de la mitocondria ($\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$) en neuronas DRGs mediante el sensor FRET 4mt-D3cpv. (A, B) Promedio de la señal 4mt-D3cpv en somas y neuritas de neuronas DRGs WT (A) y *Gdap1*-KO (B). Las señales son la media de al menos 15 células de no menos de 4 experimentos. (C) Cuantificación del área bajo la curva SOCE de somas y neuritas WT y *Gdap1*-KO. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ANOVA de dos factores (genotipo y región celular) (test post hoc Bonferroni).

Este mismo efecto se observa en neuronas cerebelares (Fig. 15).

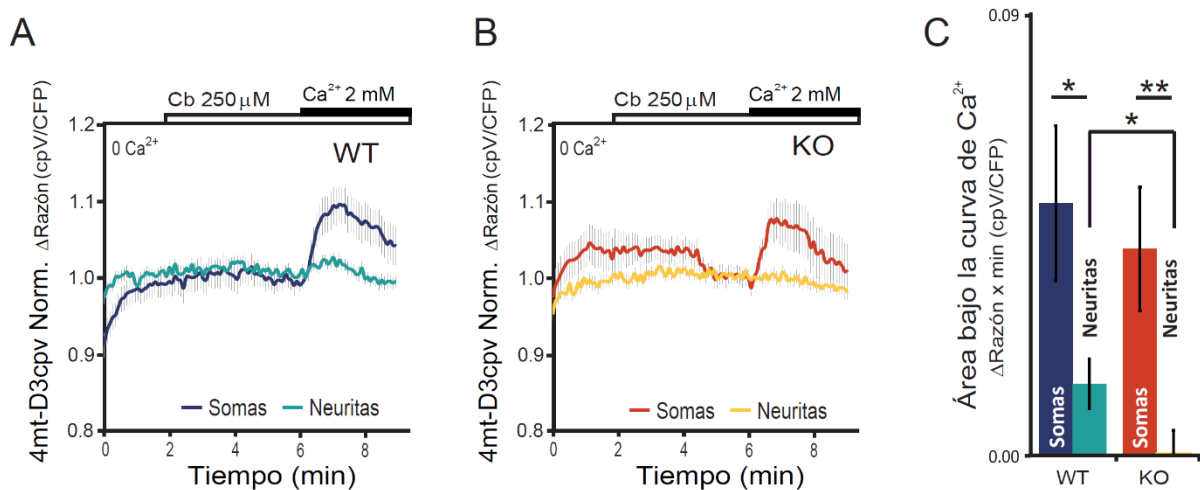


FIGURA 15. Las neuronas cerebelares *Gdap1*-KO muestran menor entrada de calcio a la mitocondria asociada a la menor activación del SOCE, siendo el defecto especialmente relevante en las neuritas. Determinación de las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ en neuronas cerebelares mediante el sensor FRET 4mt-D3cpv. (A, B) Promedio de la señal 4mt-D3cpv en somas y neuritas de neuronas cerebelares WT (A) y *Gdap1*-KO (B). Las señales son la media de al menos 14 células de no menos de 4 experimentos. (C) Cuantificación del área bajo la

curva SOCE de somas y neuritas WT y *Gdap1*-KO. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, ANOVA de dos factores (genotipo y región celular) (test post hoc Bonferroni).

Esta disminución en la captura de Ca^{2+} por las mitocondrias de las neuritas cerebelares y de DRGs puede deberse a que les llega menos Ca^{2+} a través del SOCE. No se ha estudiado la capacidad de captura de Ca^{2+} de las mitocondrias de estas neuronas *Gdap1*-KO, pero no es descartable que, además de llegar menos Ca^{2+} por el SOCE, tengan algún defecto debido a la falta de GDAP1, aunque en el caso de neuroblastoma *Gdap1*-KD no se observó ningún cambio en la capacidad de captura de Ca^{2+} en mitocondrias (Pla-Martin et al., 2013).

2.2.7 Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO tienen menor potencial de membrana mitocondrial basal y menor estimulación de la respiración mitocondrial en respuesta a agentes movilizadores de Ca^{2+}

Todos los resultados anteriores indican que las neuronas DRGs *Gdap1*-KO tienen menores niveles de Ca^{2+} en el RE, menor activación del SOCE, y que esto se traduce en una menor entrada de Ca^{2+} a la mitocondria.

GDAP1 es una proteína de la membrana mitocondrial externa que juega un papel en la interacción RE-mitocondria. Para saber si la bioenergética mitocondrial se afecta en neuronas carentes de GDAP1, se estudiaron el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) y la respiración mitocondrial en condiciones basales, y en respuesta a diversos agentes que pudieran estimular la respiración, entre ellos el agonista del receptor TRPV1.

En primer lugar, observamos que las neuronas DRGs *Gdap1*-KO tienen menor $\Delta\psi$ basal, medido como el porcentaje de señal de fluorescencia TMRM calculado respecto a un máximo (oligomicina) y un mínimo (FCCP) (ver materiales y métodos): $105.44 \pm 1.21\%$ y $89.10 \pm 1.66\%$ en las neuronas WT y en las neuronas *Gdap1*-KO, respectivamente (Fig. 16A).

Además, las neuronas DRGs *Gdap1*-KO en condiciones basales tienen una respiración ligeramente inferior a los controles WT, si bien la diferencia no alcanza significación estadística. (Fig. 16B).

Además de la respiración basal, hemos estudiado la respiración mitocondrial en respuesta a diversos agentes movilizadores de Ca^{2+} . En general, las neuronas DRGs *Gdap1*-KO muestran una menor estimulación de la respiración tras la adición de taspargina (Fig. 16C y 16D) y

ATP (Fig. 16E y 16F), aunque la disminución no fue significativa. Por otro lado, la adición de carbacol no produjo apenas estimulación de la respiración mitocondrial en las neuronas DRGs WT (Fig. 16G).

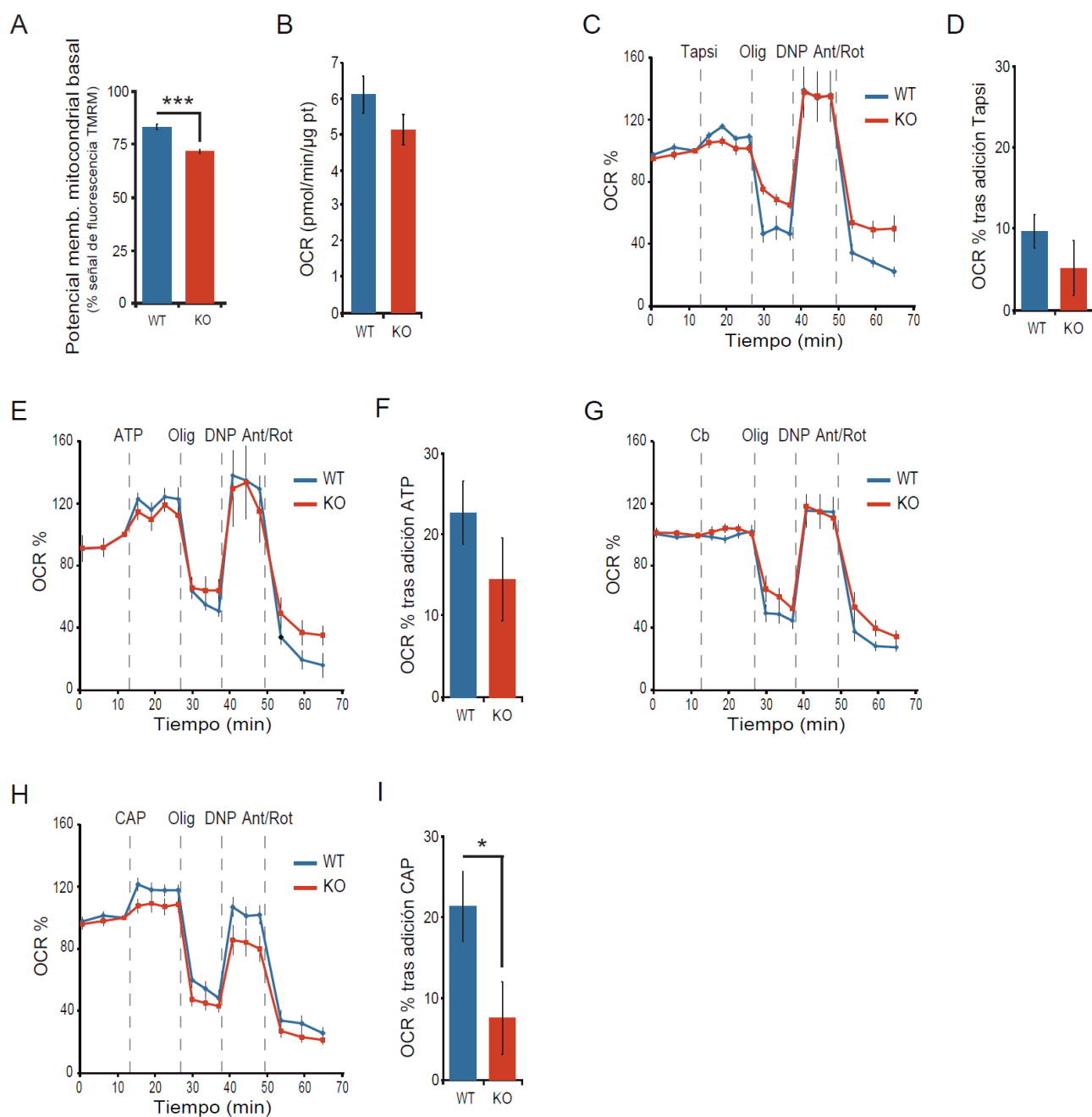


FIGURA 16. Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO tienen menor potencial de membrana mitocondrial basal y menor estimulación de la respiración mitocondrial en respuesta a agentes movilizadores de Ca^{2+} . (A) Potencial de membrana mitocondrial basal medido como el porcentaje relativo de fluorescencia TMRM en neuronas DRGs *Gdap1*-WT y KO. Se analizaron más de 200 células de al menos 3 experimentos independientes. (B-I) Medida del consumo de oxígeno celular en neuronas DRGs. (B) Cuantificación de la razón de consumo de oxígeno (OCR) basal, medida como pmoles de oxígeno consumidos por minuto normalizados por μg de proteína. Se analizaron entre 33-37 ensayos de al menos 5 experimentos independientes. (C, E, G, H) Respuesta respiratoria

a agonistas. La razón de consumo de oxígeno está expresada como porcentaje de la OCR basal tras la adición de tapsigargina (Tapsi, 1 μ M) (C), ATP (100 μ M) (E), carbacol (Cb, 250 μ M) (G) o capsaicina (CAP, 1 μ M) (H). Para la calibración del registro de OCR se utilizaron los inhibidores metabólicos: oligomicina (Olig, 6 μ M), DNP (0.25 mM) y antimicina A/rotenona (Ant/Rot, 1 μ M). (D, F, I) Cuantificación de la estimulación, expresada como % OCR, 3 minutos después de la adición del estímulo correspondiente: tapsigargina (Tapsi, 1 μ M) (D), ATP (100 μ M) (F) o capsaicina (CAP, 1 μ M) (I). Se analizaron entre 6-13 ensayos de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, test de Student.

Por último, hemos estudiado específicamente la respuesta de la respiración mitocondrial a la estimulación con capsaicina, agonista del receptor TRPV1 responsable de la detección del calor nocivo. En las neuronas DRGs la activación por capsaicina producía mayores señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ y aparentemente mayor liberación de glutamato en las neuronas *Gdap1*-KO. Sin embargo, como muestra la figura 16H, es muy significativo que a pesar de ello, la adición de capsaicina produce una menor estimulación de la respiración en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO respecto a los controles WT. La estimulación de la respiración mitocondrial en respuesta a capsaicina al primer tiempo registrado (3 minutos) es de $21.403 \pm 4.292\%$ en las neuronas WT y de $7.651 \pm 4.442\%$ en las neuronas *Gdap1*-KO (Fig. 16I).

Como conclusión, los resultados indican que el defecto en la función de la neurona DRG no parece estribar en recibir mal la señal sensitiva en las terminales nerviosas, sino que puede estar relacionado con el menor contenido de Ca^{2+} en el RE y un defecto en el SOCE relacionado con una mayor actividad de los canales VGCCs. El menor contenido de Ca^{2+} del RE puede estar relacionado con una disfunción mitocondrial causante de un menor $\Delta\psi$, una tendencia a la disminución de la respiración basal, y defectos energéticos, entre ellos una menor capacidad de estimular la respiración mitocondrial en respuesta a la percepción de la señal nociceptiva.

3. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD (PTP) EN MODELOS DE ENFERMEDADES QUE AFECTAN SECUNDARIAMENTE A LA MITOCONDRIA

Muchas enfermedades raras y comunes, inclusive aquellas que a priori no son propiamente enfermedades mitocondriales (EM), podrían tener en común una alteración en la probabilidad de apertura del poro de transición de la permeabilidad (PTP) que condujera a una deficiencia

mitocondrial patológica. El PTP se describió como un incremento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna, que requiere acumulación de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial y produce la apertura de un canal de alta conductancia que permite el libre paso de solutos con pesos de hasta 1500 kDa (Hunter and Haworth, 1979, Haworth and Hunter, 1980, Bernardi et al., 2006).

La apertura del PTP inicia una serie de procesos que finalmente conducen a la muerte celular: causa la despolarización de la mitocondria, colapsa el gradiente de protones inhibiendo la síntesis de ATP, e incluso aumentando el gasto de ATP (modo reverso de la ATP sintasa), aumenta la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), causa hinchamiento de las mitocondrias, desplegamiento de las crestas mitocondriales y, finalmente, ruptura de la membrana mitocondrial externa liberando al citosol citocromo *c* y otras proteínas pro-apoptóticas. En general, los efectos van a depender del tiempo y grado de pérdida de elementos de la matriz e incluso para tiempos cortos se puede considerar como un modo de liberar el exceso de Ca^{2+} mitocondrial (“*flickering mode*”) (Pfeiffer et al., 2001). El principal efector del PTP es la sobrecarga Ca^{2+} mitocondrial, aunque también está influido por el estado redox de la matriz, el potencial de membrana, el pH mitocondrial, y el ratio ADP/ATP (Bernardi et al., 2006, Kroemer et al., 2007). Recientemente se ha postulado que la F_0F_1 ATP sintasa constituye el canal del PTP (Giorgio et al., 2013), aunque se ha postulado la implicación de otras proteínas mitocondriales en su regulación, siendo la principal la ciclofilina D cuyo inhibidor ciclosporina A (CsA) aumenta la capacidad de retención de calcio, disminuyendo la muerte asociada al PTP (Kroemer et al., 2007, Bernardi et al., 2006). Esto abre la posibilidad de utilizar derivados no inmunosupresores del CsA para tratar enfermedades que cursen con el PTP como elemento conducente a muerte celular, bien sea de forma primaria o secundaria.

Hemos encontrado varias disfunciones mitocondriales asociadas a la ausencia de GDAP1 y ahora nos proponemos estudiar si el poro de transición de la permeabilidad está alterado en la enfermedad de CMT asociada a *Gdap1*. Sin embargo, poner en evidencia esta alteración es difícil por la falta de protocolos establecidos y por la dificultad en obtener muestras correspondientes al sistema afectado, es decir biopsias del SNC. Los cultivos de fibroblastos procedentes de biopsias se pueden utilizar como alternativa a sistemas celulares menos accesibles para el estudio de la etiología de las enfermedades, ya que a menudo recapitulan los procesos moleculares asociados a la enfermedad (Sabatelli et al., 2012). Por lo que nos hemos propuesto también poner a punto un sistema experimental que permita valorar en fibroblastos de pacientes la susceptibilidad a la apertura del PTP y su posible inclusión en pruebas clínicas

con inhibidores del poro. Para ello vamos a utilizar fibroblastos murinos de ratón (MEFs) carentes de GDAP1, comparando el sistema experimental en otros modelos celulares en los que se conoce o sospecha que el PTP está alterado, como son los MEFs carentes de SCaMC-3 o heterocigotos para ADCK2.

3.1 SCaMC-3

Los SCaMCs (o short-CaMCs también llamados APCs) pertenecen a la superfamilia de transportadores mitocondriales (MCF) o familia de transportadores de solutos 25 (SLC25) y se corresponden con los transportadores mitocondriales de ATP-Mg²⁺/Pi (Fiermonte et al., 2004, del Arco and Satrustegui, 2004).

Los transportadores ATP-Mg²⁺/Pi ejecutan el intercambio electroneutro de ATP-Mg²⁺ (MgATP²⁻) o ADP (HADP²⁻) por Pi (HPO₄²⁻) a través de la IMM (Fiermonte et al., 2004), controlando así los niveles netos de AdNs (AMP+ADP+ATP) en la matriz (Joyal and Aprille, 1992), lo que representa una ruta alternativa para el transporte mitocondrial de nucleótidos a través del AAC que realiza un estricto intercambio ADP/ATP (Traba et al., 2008).

Gracias a la capacidad de modular el contenido en AdNs de la mitocondria, se propuso que el transportador ATP-Mg²⁺/Pi podría afectar a importantes funciones celulares como la actividad respiratoria o la biogénesis mitocondrial así como la actividad de procesos dependientes de ATP de la matriz como la gluconeogénesis o la síntesis de urea en el hígado (Aprille, 1993, Amigo et al., 2013).

En mamíferos, hay cinco isoformas del transportador ATP-Mg²⁺/Pi; SCaMC-1/SLC25A24, SCaMC-2/SLC25A25, SCaMC-3/SLC25A23, SCaMC-1L/SLC25A54, SCaMC-3L/SLC25A41.

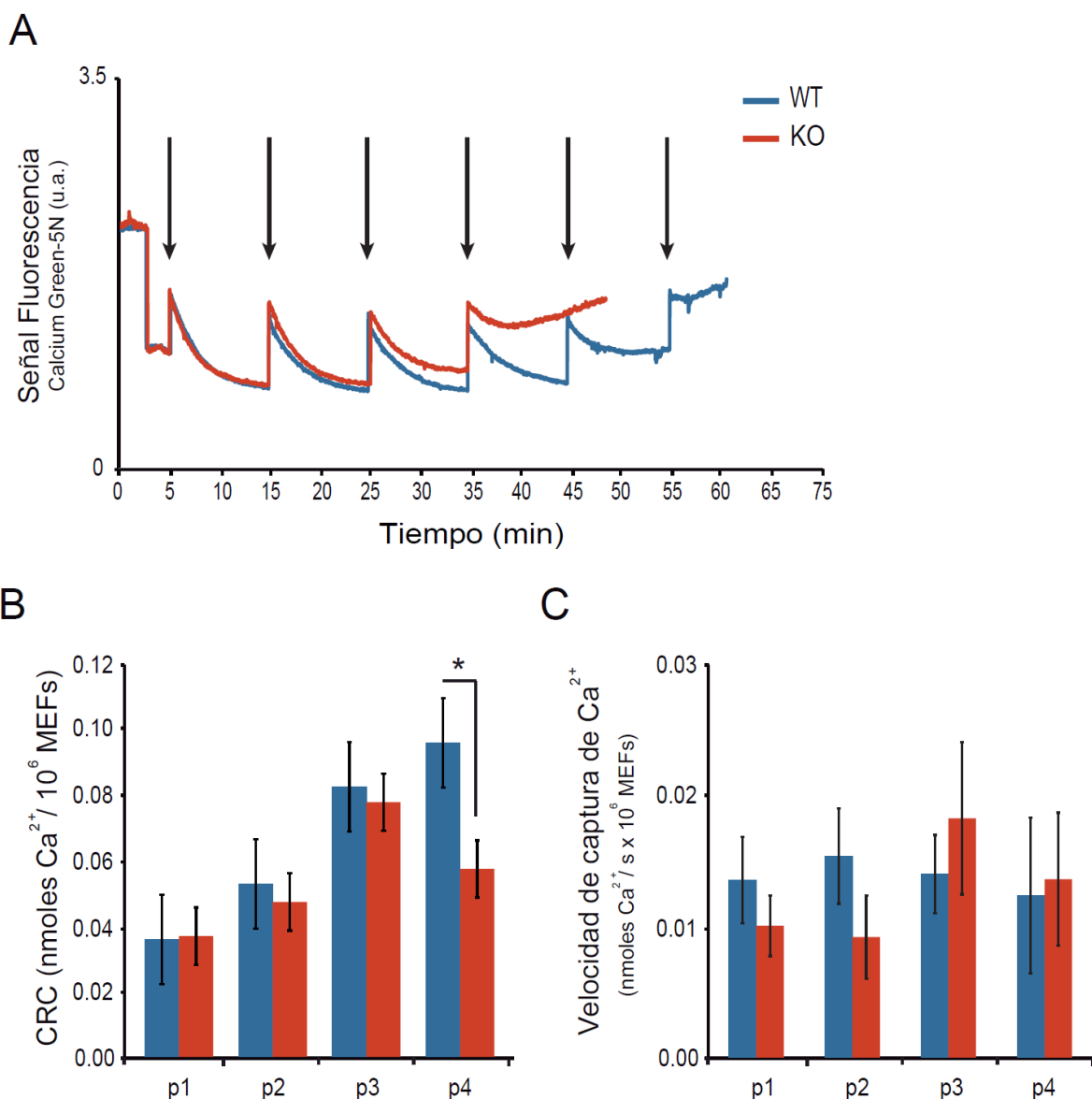
SCaMC-1/SLC25A24 se expresa abundantemente en células tumorales y tejidos embrionarios, SCaMC-2/SLC25A25 en músculo esquelético y cerebro, y SCaMC-3/SLC25A23 se expresa preferentemente, pero no exclusivamente, en hígado y cerebro (del Arco and Satrustegui, 2004, Satrustegui et al., 2007, Traba et al., 2012, Amigo et al., 2013, Rueda et al., 2015).

La actividad de SCaMC-3 aumenta el contenido neto de adenín nucleótidos en la matriz mitocondrial y aumenta la capacidad de retención de calcio (CRC) de la mitocondria,

haciéndola menos susceptible a la apertura del PTP (Amigo et al., 2013), por lo que los MEFs *SCaMC3-KO* constituyen un buen modelo para testar ensayos de PTP.

3.1.1 Los fibroblastos murinos de ratón (MEFs) procedentes de ratones *SCaMC3-KO* tienen menor capacidad de retención de calcio

El principal efector del PTP es un aumento patológico del Ca^{2+} intracelular, aunque también están implicados otros factores como las ROS. Por lo tanto, uno de los principales factores a tener en cuenta en patologías asociadas con defectos mitocondriales que cursan con susceptibilidad al PTP es la capacidad de retención de Ca^{2+} (CRC) mitocondrial, es decir, la capacidad por parte de la mitocondria de tamponar calcio sin desencadenar la apertura del PTP (Bernardi et al., 2006, Kroemer et al., 2007).



(página anterior) **FIGURA 17. Los MEFs *SCaMC3-KO* tienen menor capacidad de retención de calcio (CRC).** (A) Experimento representativo de CRC en MEFs permeabilizados a pase celular 3. Las flechas indican adiciones de 0.025 nmols de CaCl_2 . (B) Promedio de la CRC a diferentes pases celulares. (C) Promedio de la velocidad de captura de Ca^{2+} calculada a partir de la pendiente en los primeros 5 segundos la primera adición de calcio a diferentes pases celulares. Se analizaron un total de 6-12 ensayos de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, test de Student pareado de dos colas.

Para evaluar este punto, hemos realizado ensayos de captura de Ca^{2+} por parte de MEFs permeabilizados con digitonina para controlar directamente el ambiente iónico de la mitocondria (Traba et al., 2012), y en presencia de tapsigargina para inhibir la actividad de la Ca^{2+} -ATPasa del retículo endoplásmico (SERCA), evitando así la contribución del RE a la disminución del Ca^{2+} en el medio.

Los MEFs *SCaMC3-KO* presentan una menor CRC que los MEFs WT especialmente a pases altos (0.096 ± 0.014 y 0.064 ± 0.008 nmols Ca^{2+} / 10^6 MEFs WT y *SCaMC3-KO* a pase 4, respectivamente) (Fig. 17A y 17B), sin que haya diferencias significativas en la velocidad de captura de Ca^{2+} (Fig. 17C). El tratamiento con ciclosporina A (CsA), un conocido inhibidor del PTP, elimina las diferencias entre genotipos en CRC (resultados no mostrados). Estos resultados son similares a los descritos en mitocondrias aisladas de hígado (Amigo et al., 2013) y cerebro (Rueda et al., 2015) de ratones *SCaMC3-KO* y a los descritos para otro miembro de esta familia de proteínas, *SCaMC-1* (Traba et al., 2012).

3.1.2 Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3-KO* no muestran alteraciones en la respiración mitocondrial

La CRC, el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mit}}$) y la apertura del PTP están muy influenciados por el estado energético de la mitocondria. Para descartar un defecto puramente energético como causantes de la susceptibilidad al PTP, hemos realizado ensayos de respiración en células intactas (Fig. 18A). No se observan diferencias entre genotipos ni a nivel basal (Fig. 18B), ni en la respiración acoplada (sensible a oligomicina) (Fig. 18C) ni en la respiración máxima (Fig. 18D).

Tampoco hemos encontrado diferencias en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ basal medido con la sonda ratiométrica JC-1 (Fig. 19A y 20B) o con el indicador fluorescente TMRM (Fig. 19C y 19D), ni en la morfología basal de la red mitocondrial (Fig. 19D-G). Estos resultados son consistentes con

estudios previos en otros modelos que no vieron diferencias bioenergéticas asociadas a la ausencia de SCaMC-3 (Amigo et al., 2013, Rueda et al., 2015).

Estos resultados descartan que la menor CRC, y por tanto la apertura temprana del PTP, se deban a un peor estado bioenergético celular, por ejemplo, una menor capacidad de hacer frente al gasto energético que suponen los flujos de calcio.

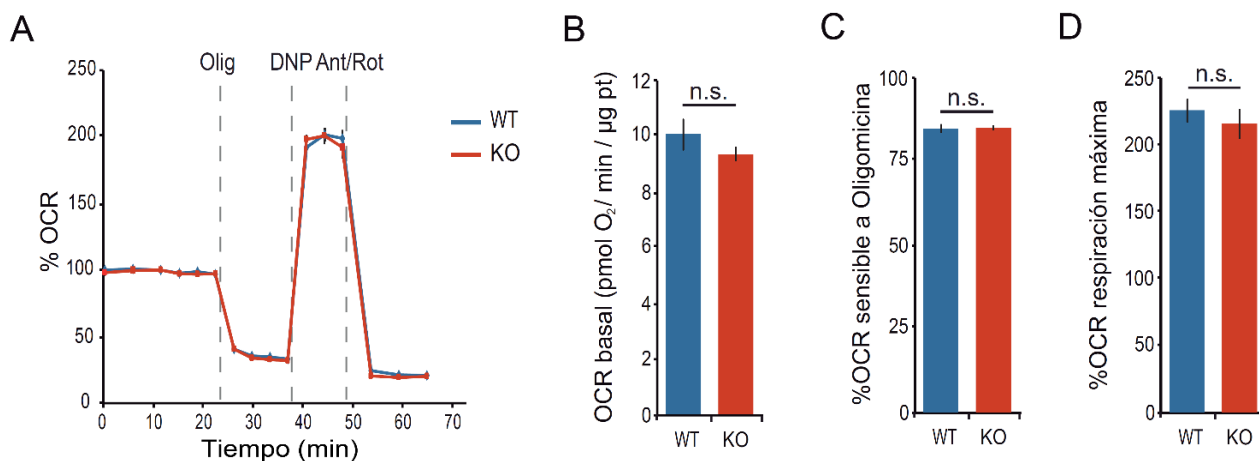
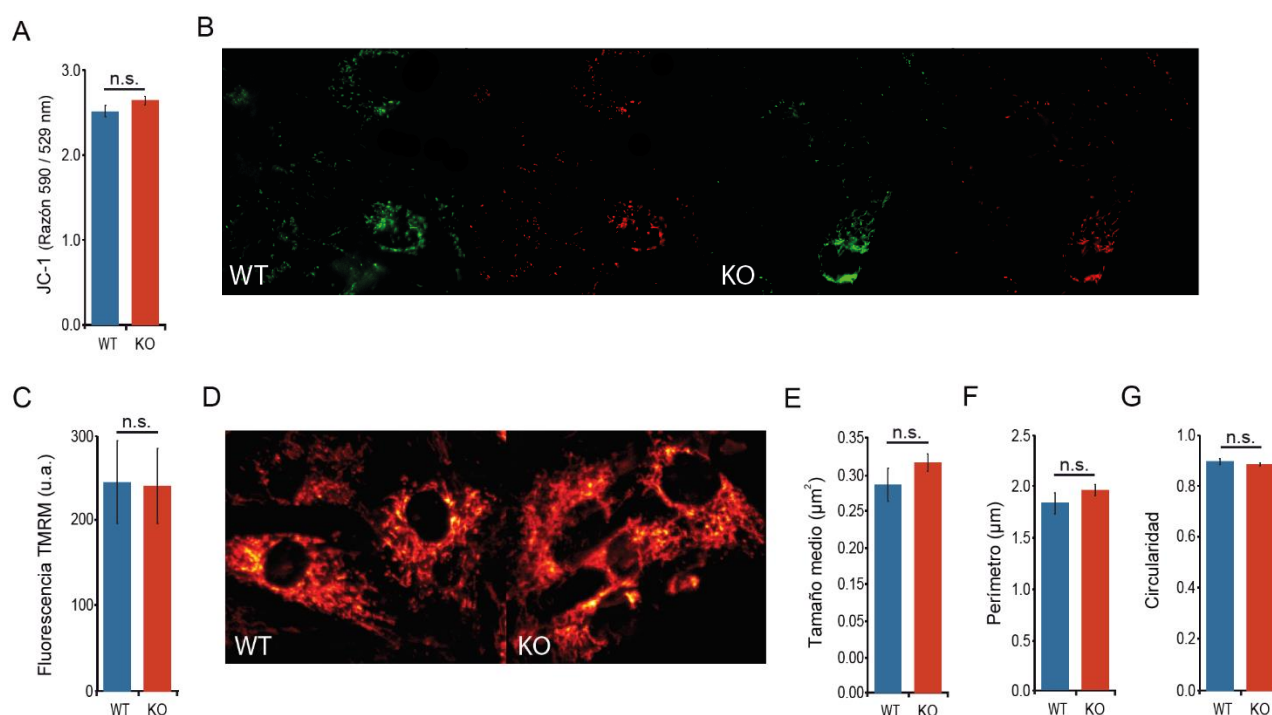


FIGURA 18. Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3-KO* no muestran alteraciones en la respiración mitocondrial. (A) Razón de consumo de oxígeno expresada como el porcentaje de la OCR basal MEFs WT y *SCaMC3-KO*. (B) OCR basal, medida como pmoles de oxígeno consumidos por minuto normalizados por µg de proteína. (C) OCR sensible a oligomicina, expresada como el porcentaje de la OCR basal y respiración máxima, expresada como el porcentaje de la OCR basal (D). Los datos están expresados como media ± SEM de al menos 2 ensayos de 3 experimentos independientes. *n.s.* no significativo, test de Student pareado de dos colas.



(página anterior) **FIGURA 19. Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3-KO* no muestran alteraciones en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ basal ni en la morfología mitocondrial.** (A, B) Determinación (A) e imágenes representativas (B) del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mit}}$) con la sonda JC-1, calculado a partir de la razón en la señal de fluorescencia roja/verde. (C, D) Determinación (C) e imágenes representativas (D) del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ mediante la sonda TMRM. (E-G) Análisis de la morfología mitocondrial, medida como tamaño medio (E), perímetro (F) y circularidad (G). Se analizaron un total de 36 imágenes de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *n.s.* no significativo, test de Student pareado de dos colas.

3.1.3 Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3-KO* son más susceptibles a la apertura del PTP

Como hemos explicado previamente, la apertura del PTP implica una pérdida de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$. Por lo que hemos monitorizado la mayor propensión a la apertura del PTP estudiando las variaciones en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ mediante la cuantificación de la fluorescencia del tetrametilrodamina metil éster (TMRM) visualizada con microscopio de fluorescencia (*imaging* de TMRM), en el modo *non-quench* en respuesta a inhibidores y agonistas. En este método, la baja concentración de sonda se acumula a favor de potencial de membrana en el interior de la matriz mitocondrial, de modo que a mayor $\Delta\Psi_{\text{mit}}$, más fluorescencia y viceversa.

En células con un PTP más activo, la ATPasa funciona hidrolizando ATP para oponerse a la caída de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ por lo que la adición del inhibidor oligomicina se traduce en una caída de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ (Zulian et al., 2014), mientras que en las células sanas produce un incremento de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$, ya que no se consume para la producción de ATP.

La figura 20 muestra que, mientras los controles WT responden a la adición de oligomicina con un incremento en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$, los MEFs *SCaMC3-KO* muestran una caída en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ respecto al valor inicial (ver gráfica representativa a pases 3-4, fig. 20A).

La diferencia entre genotipos es especialmente relevante a pases tardíos (p3-p4) (Fig. 20C). Por ello se seleccionaron los pases 3-4 para realizar todos los experimentos.

Después de la adición de oligomicina (14 min después) los valores de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ fueron de $129.81 \pm 30.34\%$ y de $55.59 \pm 16.66\%$ en los MEFs WT y *SCaMC3-KO*, respectivamente (Fig. 20A y 20D). Para comprobar que la disminución observada en los MEFs *SCaMC3-KO* se debe efectivamente a una apertura del PTP, hemos utilizado el inhibidor CsA. En este caso, no se observa una caída en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ en ningún genotipo, siendo los valores del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ de $150.43 \pm$

41.34% y de $125.50 \pm 15.38\%$ en los MEFs WT y *SCaMC3*-KO, respectivamente (Fig. 20C y 20D).

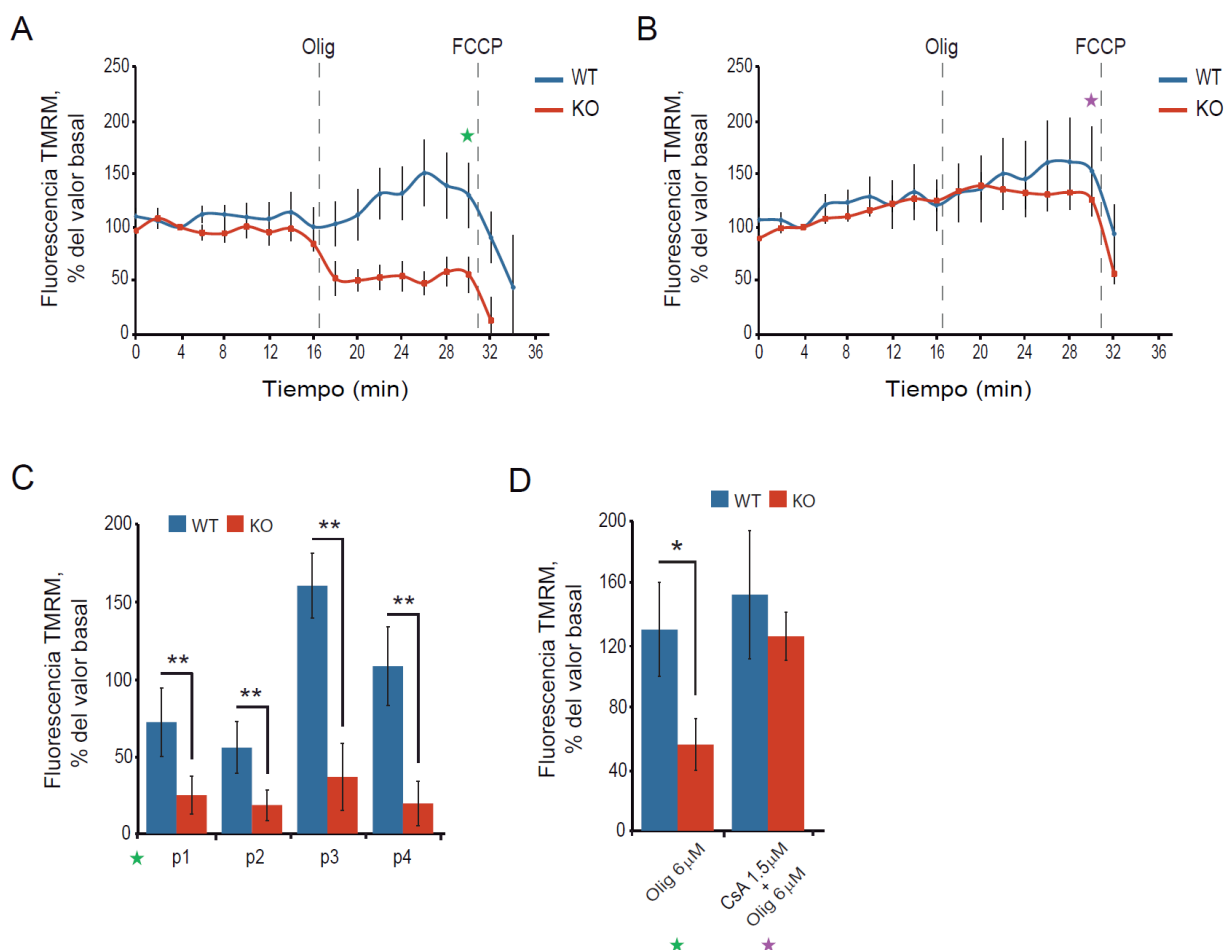


FIGURA 20. Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3*-KO son más susceptibles a la apertura del PTP. (A, B) Experimentos representativos a pases 3-4 en ausencia (A) o presencia de CsA 1.5 μM (B). (C) Potencial de membrana mitocondrial, normalizado respecto a los valores basales, después de la adición de oligomicina (6 μM) a diferentes pases celulares. (D) Potencial de membrana mitocondrial normalizado respecto a los valores basales después de la adición de oligomicina en ausencia o presencia de CsA 1.5 μM. Los datos están expresados como media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes, con más de 14 células cada uno. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, test de Student apareado de dos colas.

Por lo tanto, los resultados indican que en la mitocondria en los MEFs *SCaMC3*-KO existe un estado “PTP-prone” que se pone de manifiesto como una caída en el $\Delta\Psi_{mit}$ al inhibir la síntesis mitocondrial de ATP.

3.1.4 Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3-KO* son más sensibles a agentes inductores del PTP

El H_2O_2 modifica oxidativamente muchas proteínas el RE (canales de IP_3 , rianodina, SERCA) y de la membrana (PMCA entre otras) (Camello-Almaraz et al., 2006) produciendo una descarga del Ca^{2+} del RE que es capturada por la mitocondria, lo que conduce a largo plazo a la apertura del PTP (Vaseva et al., 2012).

Al comparar el incremento de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ inducido por la adición de 0.5 mM H_2O_2 , observamos que es de menor amplitud en los MEFs *SCaMC3-KO* con respecto a los controles (Fig. 21A-C). Sin embargo, la respuesta de $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$ producida es superior (Fig. 21D y 21E), lo que sugiere que los MEFs *SCaMC3-KO* reciben mayores niveles de Ca^{2+} en la mitocondria lo que, unido a su menor CRC, contribuiría a la mayor susceptibilidad a la apertura del PTP.

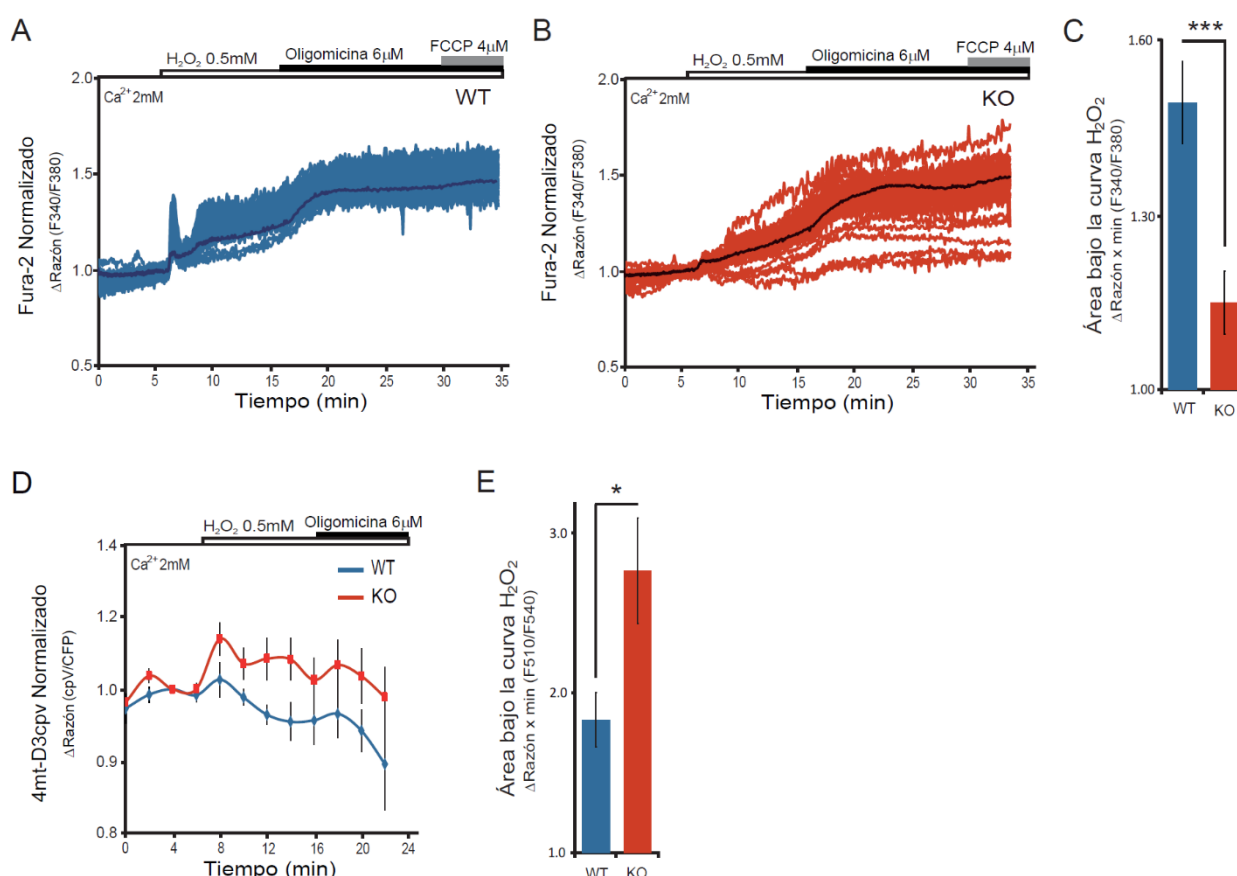


FIGURA 21 Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3-KO* son más sensibles a alteraciones en los niveles de Ca^{2+} debido a agentes inductores del PTP. (A, B) Experimentos representativos en MEFs WT (A) y *SCaMC3-KO* (B) de la respuesta de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ tras la adición de H_2O_2 0.5 mM. (C) Cuantificación del incremento en los niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ asociado al tratamiento con H_2O_2 , medido como área bajo el pico de H_2O_2 . Se analizaron un total de 90 células de al menos 3 experimentos independientes. (D) Experimento representativo con el sensor FRET 4mt-D3cpv para la determinación del $\text{Ca}^{2+}_{\text{mit}}$. (E) Promedio de la señal 4mt-D3cpv en MEFs WT y *SCaMC3-KO*

medida como área bajo la curva. Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.

Esta mayor sensibilidad a la apertura del PTP en los MEFs *SCaMC3-KO* se comprueba también cuando evaluamos el $\Delta\Psi_{mit}$. La adición de H_2O_2 (0.5mM) induce una caída del $\Delta\Psi_{mit}$ en los *SCaMC3-KO*, pero no en los controles WT: $38.27 \pm 10.76\%$ y $91.97 \pm 18.03\%$, valores del $\Delta\Psi_{mit}$ respectivamente (Fig. 23A y 23C). La caída del $\Delta\Psi_{mit}$ es sensible al tratamiento con CsA 1.5 μ M: $138.48 \pm 16.64\%$ y $89.82 \pm 15.17\%$, valores del $\Delta\Psi_{mit}$ en los MEFs *SCaMC3-KO* y WT respectivamente (Fig. 22B y 22C).

Otros estímulos que causan una señal potente de calcio podrían también inducir la apertura del PTP. Por ejemplo la bradiquinina (BQ) provoca una caída del $\Delta\Psi_{mit}$ ligeramente mayor en los MEFs *SCaMC3-KO* que en los WT: $24.97 \pm 16.64\%$ y $42.94 \pm 12.29\%$, valores del $\Delta\Psi_{mit}$ respectivamente (Fig. 23D y 23F). De nuevo, la caída del $\Delta\Psi_{mit}$ es sensible a CsA: $95.64 \pm 7.42\%$ y $108.65 \pm 22.90\%$, valores del $\Delta\Psi_{mit}$ en los MEFs *SCaMC3-KO* y WT respectivamente (Fig. 23E y 23F), lo que pone de manifiesto la inducción de PTP por bradiquinina aunque en este caso la dosis empleada de BQ no permite discriminar significativamente entre genotipos.

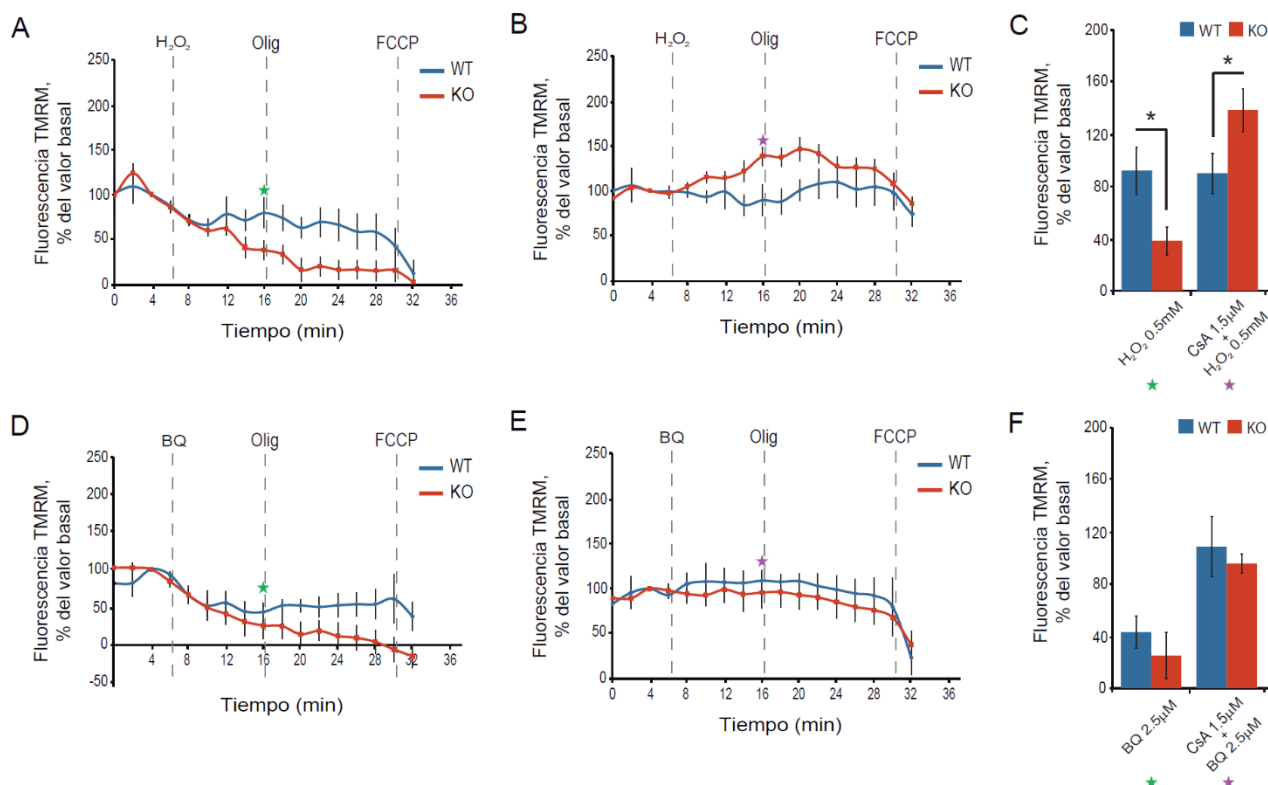


FIGURA 22. Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3-KO* son más sensibles a agentes inductores del PTP. (A, B) Experimentos representativos para el tratamiento con H_2O_2 0.5 mM en ausencia (A) o presencia de

CsA 1.5 μ M (B). (C) Potencial de membrana mitocondrial normalizado respecto a los valores basales después de la adición de H₂O₂ 0.5 mM en ausencia o presencia de CsA 1.5 μ M. (D, E) Experimentos representativos para el tratamiento con bradiquinina 2.5 μ M en ausencia (D) o presencia de CsA 1.5 μ M (E). (F) Potencial de membrana mitocondrial normalizado respecto a los valores basales después de la adición de bradiquinina 2.5 μ M en ausencia o presencia de CsA 1.5 μ M. Los datos están expresados como media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes, con más de 18 células cada uno. * $p < 0.05$, test de Student pareado de dos colas.

3.1.5 Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3-KO* son más susceptibles a la muerte causada por agentes inductores del PTP

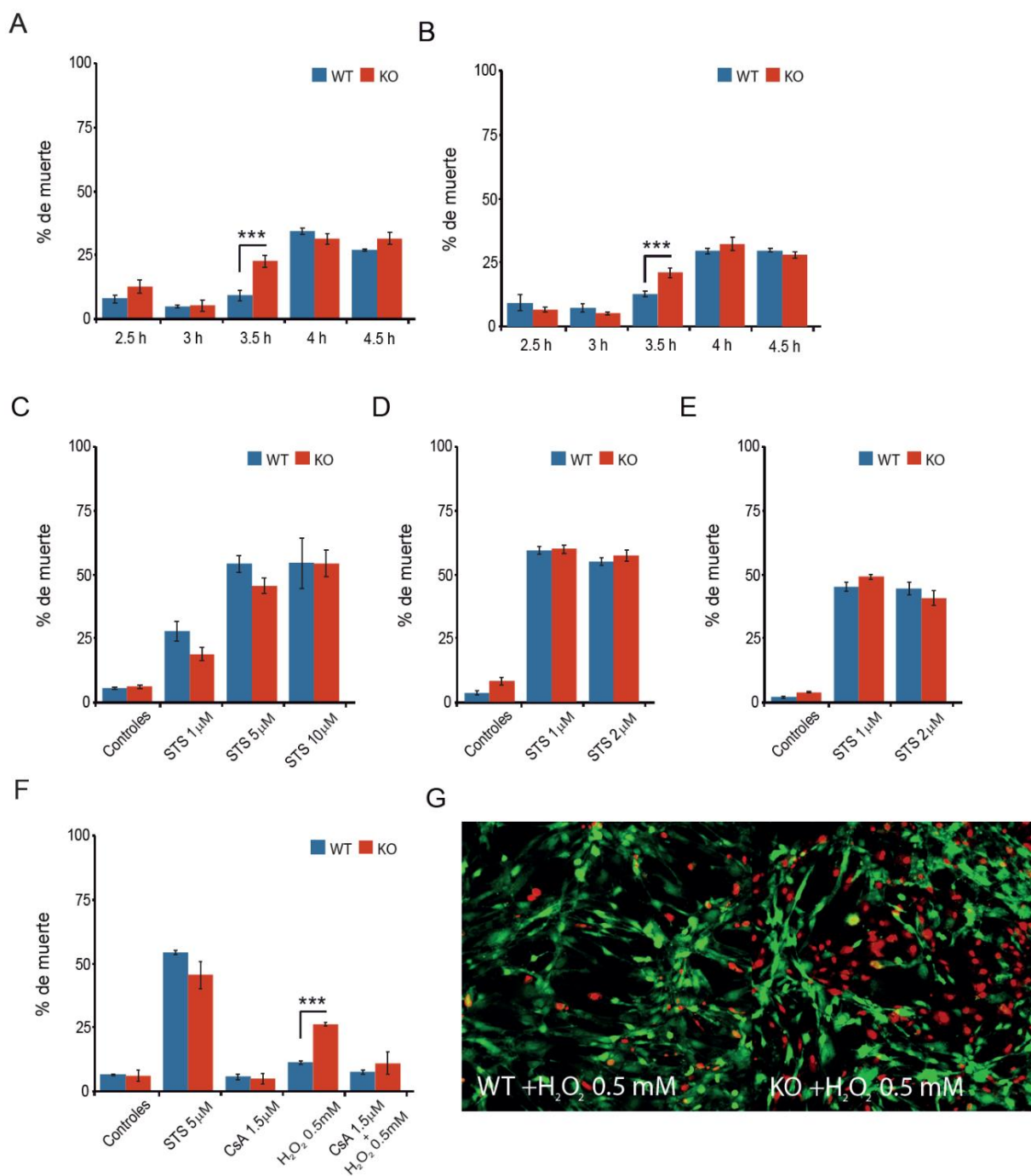
Asimismo, la mayor sensibilidad a PTP se asocia con una mayor muerte celular que podría contribuir a la degeneración celular en numerosas patologías. Efectivamente, la adición de H₂O₂ induce una muerte que es significativamente superior en los MEFs *SCaMC3-KO* a las 3.5h: la adición de 0.5 mM H₂O₂ induce una muerte de $11.34 \pm 1.55\%$ en los MEFs WT y $26.32 \pm 1.89\%$ en los MEFs *SCaMC3-KO* (Fig. 23A). Los efectos son similares utilizando la dosis de 0.5 mM H₂O₂ ($9.31 \pm 2.07\%$ en los WT y $22.63 \pm 2.32\%$ en los MEFs *SCaMC3-KO*) (Fig. 23A y 23B) o de 1 mM H₂O₂ ($12.63 \pm 1.05\%$ en los WT y $20.93 \pm 1.85\%$ en los MEFs *SCaMC3-KO*) (Fig. 23C).

La menor supervivencia de los MEFs *SCaMC3-KO* no se observa sin embargo con el tratamiento con estaurosporina, un agente inductor de muerte que no implica a la mitocondria ($54.35 \pm 3.39\%$ en los WT y $45.60 \pm 3.04\%$ en los MEFs *SCaMC3-KO*) (Fig. 23A y 23D-F). La mayor toxicidad de H₂O₂ en los MEFs *SCaMC3-KO* se debe a la mayor sensibilidad a la apertura del PTP, ya que se reduce en presencia de CsA ($7.72 \pm 0.57\%$ en los WT y $11.11 \pm 1.64\%$ en los MEFs *SCaMC3-KO*) (Fig. 23A).

Estos resultados ponen de manifiesto la disfunción mitocondrial latente (es decir, un mayor estado de apertura del PTP) en los MEFs *SCaMC3-KO*, que requieren el funcionamiento reverso de la ATPasa para mantener el $\Delta\Psi_{mit}$ a niveles similares a los controles y valida el uso de este método para diagnosticar la presencia latente de disfunciones mitocondriales en las que participa el PTP.

(página siguiente) **FIGURA 23. Los MEFs procedentes de ratones *SCaMC3-KO* son más susceptibles a la muerte causada por agentes inductores del PTP.** (A, B) Calibración de la dosis y tiempo de tratamiento con H₂O₂ 0.5 mM (A) y H₂O₂ 1 mM (B). (C-E) Calibración de la dosis y tiempo del tratamiento con estaurosporina durante 3.5 h (C), 6.5 h (D) y 9 h (E). (F) Porcentaje de muerte tras el tratamiento con estaurosporina (STS 5 μ M), ciclosporina A (CsA 1.5 μ M), H₂O₂ (0.5 mM), ó H₂O₂ + CsA (0.5 mM + 1.5 μ M) durante 3.5 h. (G) Imágenes

representativas en MEFs WT y *SCaMC3*-KO tras el tratamiento con H_2O_2 (0.5 mM, 3.5 h). Se analizaron 8-12 ensayos de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.



3.2 ADCK-2

La coenzima Q_{10} (Co Q_{10}) es un lípido soluble que se encuentra en prácticamente todas las membranas celulares y que transporta electrones desde los Complejos I y II al Complejo III de

la cadena respiratoria mitocondrial. La CoQ₁₀ es esencial para la producción de ATP mitocondrial, además está implicada en otras muchas rutas celulares, como co-factor de otras deshidrogenasas mitocondriales, como antioxidante, también participa en la beta-oxidación de los ácidos-grasos y en la biosíntesis de pirimidinas, y como regulador del mPTP (Fontaine et al., 1998, Martinucci et al., 2000). LaCoQ₁₀ y sus análogos modulan el PTP de forma reversible a altas concentraciones de calcio, y se ha encontrado una mayor susceptibilidad al PTP en células de pacientes con deficiencia secundaria en CoQ₁₀ que responden a la administración en dieta del coenzima (Cotan et al., 2011).

Su biosíntesis y regulación es compleja y las mutaciones en genes que participan en estos procesos de forma directa (deficiencia primaria) o indirecta (deficiencia secundaria) contribuyen a un grupo de desórdenes con fenotipo clínico variable. La deficiencia secundaria en CoQ₁₀ es muy común en desórdenes relacionados o no con la fosforilación oxidativa (Rodríguez-Aguilera et al., 2017).

El gen *ADCK2* pertenece a la familia de las quinasas con el motivo aarF y es uno de los genes necesario para la biosíntesis de CoQ₁₀ (Blumkin et al., 2014, Ashraf et al., 2013). Aunque *ADCK2* no se ha identificado como causa de deficiencia primaria en CoQ₁₀, si se ha relacionado junto con *ADCK3* y *ADCK4* con casos de ataxia (Lagier-Tourenne et al., 2008). El ratón KO para *ADCK2* (generado por el grupo del Dr. Plácido Navas en la Universidad Pablo de Olavide) es letal embrionario, pero un modelo de ratón heterocigoto *ADCK2*^{+/-} reproduce la patología humana y desarrolla una disfunción mitocondrial y deficiencia de CoQ₁₀ en el músculo e hígado por un defecto de la beta-oxidación de los ácidos grasos (Vázquez-Fonseca, 2016).

Dado el papel regulador de la CoQ₁₀ en el PTP, nos planteamos validar el sistema experimental desarrollado para detectar la apertura del PTP en MEFs heterocigotos para *ADCK2* (*ADCK2*-HT).

3.2.1 Los MEFs procedentes de ratones *ADCK2*-HT no muestran alteraciones en el $\Delta\Psi_{mit}$ basal ni en la morfología mitocondrial

Como hemos explicado previamente, la apertura del PTP está muy influenciada por el estado energético de la mitocondria por lo que es necesario descartar efectos puramente energéticos como causantes de la susceptibilidad al PTP. No hemos encontrado diferencias significativas en los MEFs *ADCK2*-HT respecto a los controles WT en el $\Delta\Psi_{mit}$ basal medido con el indicador

fluorescente TMRM (Fig. 24A y 24B), ni en la morfología basal de la red mitocondrial (Fig. 24C-E).

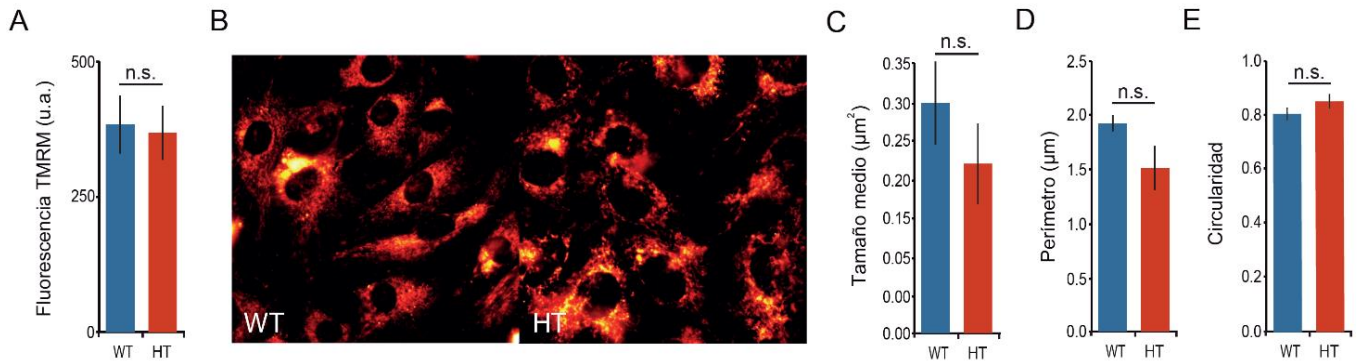


FIGURA 24. Los MEFs procedentes de ratones *ADCK2*-HT no muestran alteraciones en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ basal ni en la morfología mitocondrial. (A, B) Determinación (A) e imágenes representativas (B) del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ mediante la sonda TMRM. (C-E) Análisis de la morfología mitocondrial, medida como tamaño medio (C), perímetro (D) y circularidad (E). Se analizaron un total de 36 imágenes de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *n.s.* no significativo, test de Student pareado de dos colas.

3.2.2 Los MEFs procedentes de ratones *ADCK2*-HT son más susceptibles a la apertura del PTP

Igual que con los MEFs *SCaMC3*, hemos monitorizado la mayor propensión a la apertura del PTP mediante la cuantificación de la fluorescencia del TMRM, como indicador del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$, en los MEFs *ADCK2*-HT.

Nuestros resultados muestran que los MEFs *ADCK2*-HT responden a la adición de oligomicina con una caída en lugar del incremento en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ observado en los controles WT (Fig. 25A y 25B): el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ tras añadir oligomicina es de $33.99 \pm 10.15\%$ en los MEFs *ADCK2*-HT mientras que en los controles WT es de $117.02 \pm 29.85\%$, respecto a los valores iniciales.

Esta mayor sensibilidad a la apertura del PTP en los MEFs *ADCK2*-HT se comprueba también cuando evaluamos el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$. La adición de H_2O_2 (0.5mM) induce una caída del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ en los *ADCK2*-HT, pero no en los controles WT: $38.27 \pm 10.76\%$ y $91.97 \pm 18.03\%$, valores del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ respectivamente (Fig. 23A y 23C). La caída del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ es sensible al tratamiento con CsA 1.5 μM : $138.48 \pm 16.64\%$ y $89.82 \pm 15.17\%$, valores del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ en los MEFs *ADCK2*-HT y WT respectivamente (Fig. 22B y 22C).

Esta mayor sensibilidad a la apertura del PTP en los MEFs *ADCK2*-HT se comprueba también cuando tratamos con agentes inductores del PTP como el H_2O_2 . La adición de H_2O_2 (0.5mM) induce una caída del $\Delta\Psi_{mit}$ mucho mayor en los *ADCK2*-HT respecto a los controles WT: $67.65 \pm 9.40\%$ y $107.45 \pm 6.20\%$, valores del $\Delta\Psi_{mit}$ respectivamente (Fig. 25B y 25C). La caída del $\Delta\Psi_{mit}$ es sensible al tratamiento con CsA 1.5 μM : $94.56 \pm 8.64\%$ y $110.00 \pm 10.02\%$, valores del $\Delta\Psi_{mit}$ en los MEFs *ADCK2*-HT y WT respectivamente (Fig. 25B y 25D).

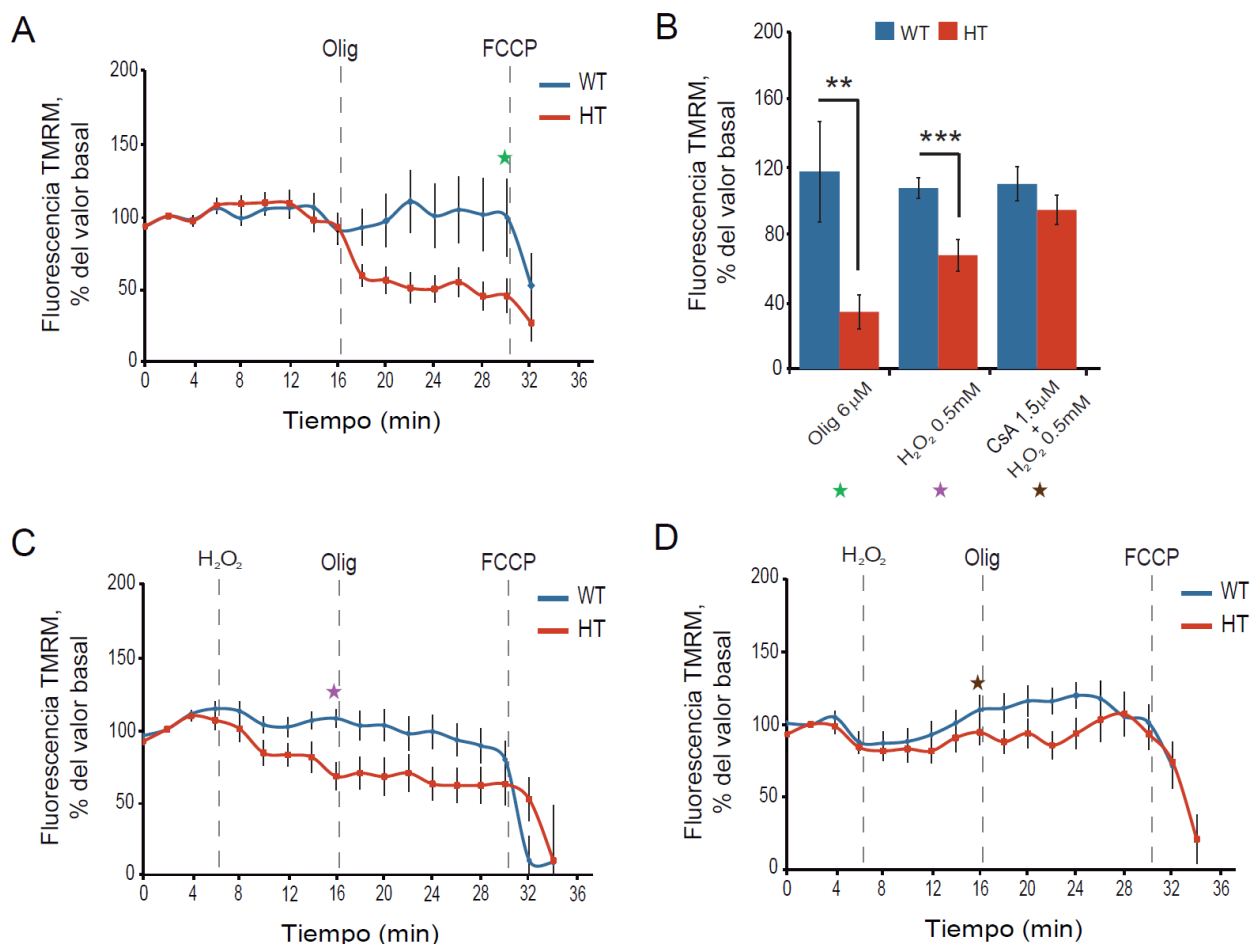


FIGURA 25. Los MEFs procedentes de ratones *ADCK2*-HT son más susceptibles a la apertura del PTP. (A) Experimento representativo en ausencia del tratamiento con H_2O_2 . **(B)** Potencial de membrana mitocondrial normalizado respecto a los valores basales para los distintos tratamientos después de la adición de oligomicina en ausencia o presencia de CsA 1.5 μM . **(C, D)** Experimentos representativos para el tratamiento con H_2O_2 0.5 mM en ausencia **(C)** o presencia de CsA 1.5 μM **(D)**. Los datos están expresados como media \pm SEM de al menos 3 experimentos independientes, con más de 18 células cada uno. * $p < 0.05$, test de Student pareado de dos colas.

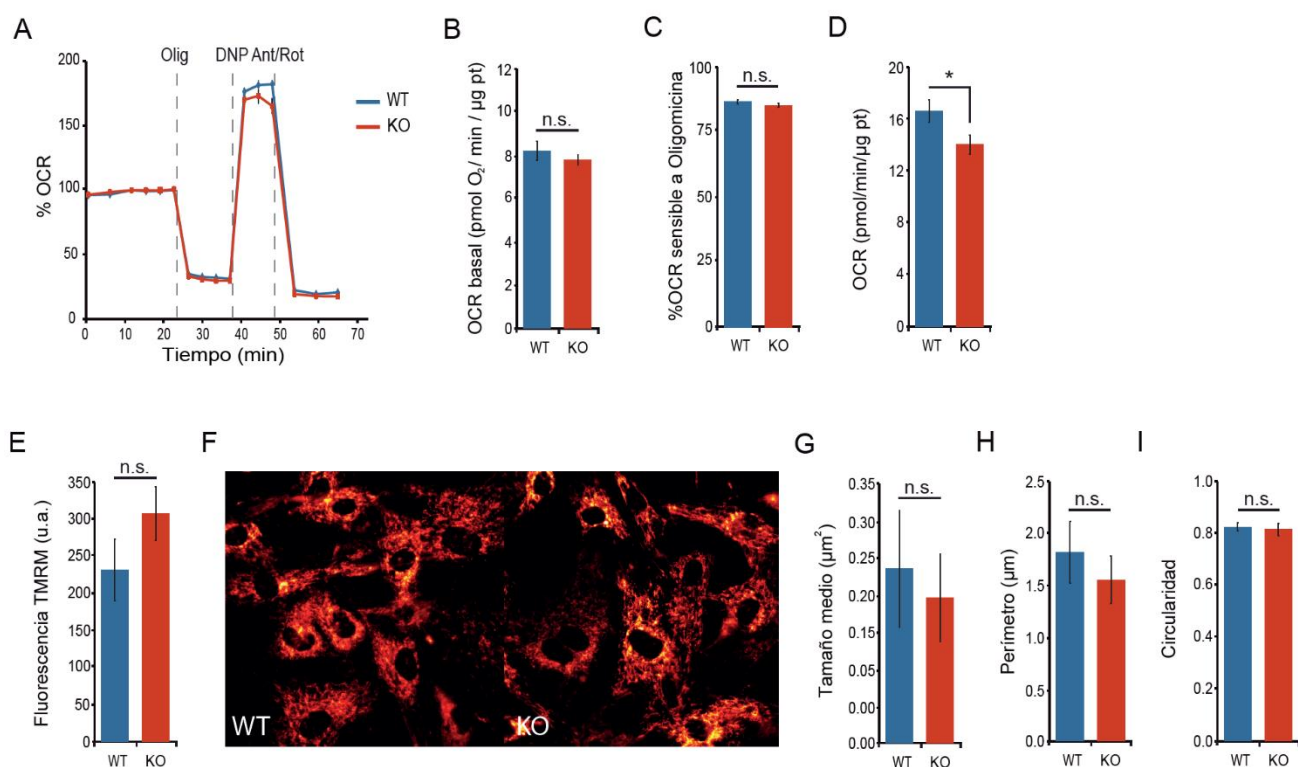
3.3 GDAP1

Por último, hemos generado MEFs procedentes de ratones *GDAP1*-KO para evaluar la posible implicación del PTP en la patología de Charcot-Marie-Tooth asociada a *Gdap1*, utilizando los protocolos validados previamente como método para diagnosticar la presencia latente de disfunciones mitocondriales en las que participa el PTP.

3.3.1 Los MEFs procedentes de ratones *Gdap1*-KO no muestran alteraciones en la respiración mitocondrial

Igual que en los modelos anteriores, hemos descartado efectos puramente energéticos como causantes de la susceptibilidad al PTP. Hemos realizado ensayos de respiración en células intactas (Fig. 26A) y no hemos observado diferencias entre genotipos a nivel basal (Fig. 26B) ni en la respiración acoplada (Fig. 26C). Sin embargo, si hemos detectado que los MEFs *GDAP1*-KO poseen una menor respiración máxima respecto a los controles WT: 16.624 ± 0.861 pmol O₂/min en los WT y 14.033 ± 0.732 pmol O₂/min en los MEFs *GDAP1*-KO, normalizado respecto a los µg de proteína (Fig. 26D).

Por otro lado, no hemos encontrado diferencias entre genotipos en el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ basal medido con el indicador fluorescente TMRM (Fig. 26E y 26F), ni en la morfología basal de la red mitocondrial (Fig. 26G-I).



(página anterior) **FIGURA 26. Los MEFs procedentes de ratones *Gdap1*-KO no muestran alteraciones en la respiración mitocondrial.** (A) Razón de consumo de oxígeno expresada como el porcentaje de la OCR basal MEFs WT y *Gdap1*-KO. (B) OCR basal, medida como pmoles de oxígeno consumidos por minuto normalizados por μg de proteína. (C) OCR sensible a oligomicina, expresada como el porcentaje de la OCR basal. (D) OCR asociada a la respiración máxima, expresada como los pmoles de O_2 consumidos por min y normalizado respecto a los μg de proteína. (E, F) Determinación (E) e imágenes representativas (F) del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ mediante la sonda TMRM. (G-I) Análisis de la morfología mitocondrial a partir de la fluorescencia TMRM de mitocondrias aisladas, medida como tamaño medio (G), perímetro (H) y circularidad (I). Se analizaron 7 ensayos de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *n.s.* no significativo, * $p < 0.05$, test de Student pareado de dos colas.

3.3.2 Los MEFs procedentes de ratones *Gdap1*-KO son más susceptibles a la apertura del PTP

De nuevo hemos monitorizado la mayor propensión a la apertura del PTP mediante la cuantificación de la fluorescencia del TMRM, como indicador del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$, en los MEFs carentes de GDAP1.

Nuestros resultados muestran que los MEFs *Gdap1*-KO responden a la adición de oligomicina con una caída del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ en lugar del incremento observado en los controles WT (Fig. 27A y Fig. 27C). La disminución de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ en los MEFs *Gdap1*-KO no tiene lugar en presencia de CsA (Fig. 27B y Fig. 27C). Tras la adición de oligomicina los valores de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ fueron de $135.78 \pm 15.07\%$ y de $18.23 \pm 31.90\%$ en los MEFs WT y *Gdap1*-KO, respectivamente (Fig. 27A y Fig. 27C). Mientras que con el tratamiento con CsA los valores de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ fueron de $108.55 \pm 9.79\%$ y de $98.85 \pm 15.20\%$ en los MEFs WT y *Gdap1*-KO, respectivamente (Fig. 27B y Fig. 27C).

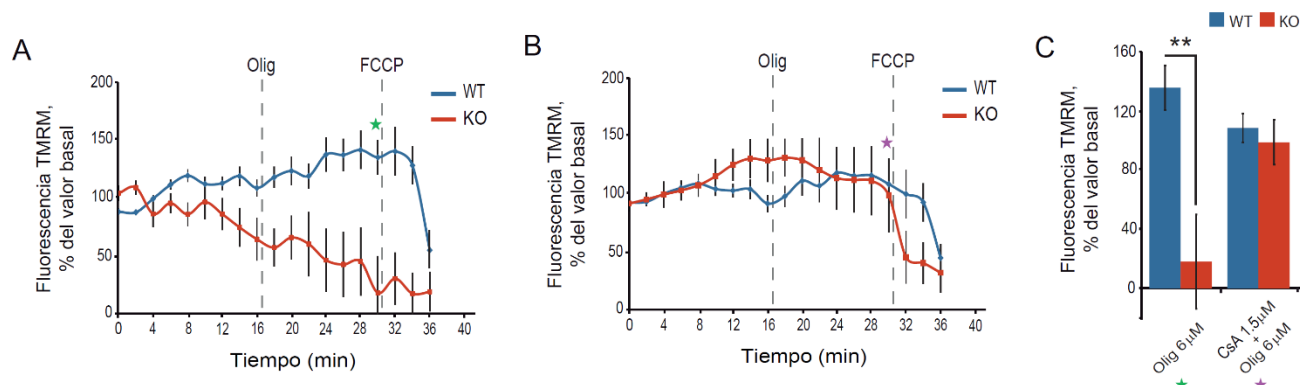


FIGURA 27. Los MEFs procedentes de ratones *Gdap1*-KO son más susceptibles a la apertura del PTP. Determinación del $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ en MEFs intactos. (A, B) Experimentos representativos en ausencia (A) o presencia de

CsA 1.5 μ M (B). (C) Potencial de membrana mitocondrial normalizado respecto a los valores basales después de la adición de oligomicina en ausencia o presencia de CsA 1.5 μ M. Se analizaron un total de 78 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.

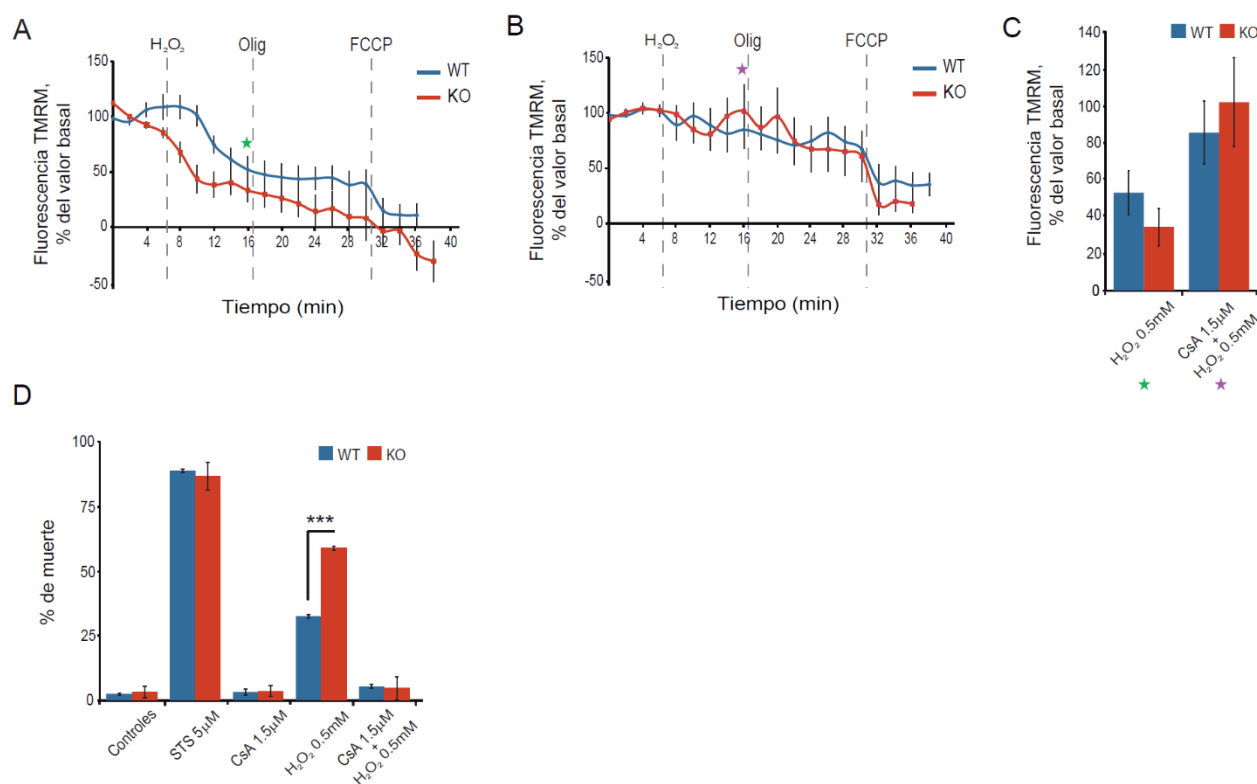
3.3.3 Los MEFs procedentes de ratones *Gdap1*-KO son más sensibles a agentes inductores del PTP

Al igual que sucedía con los MEFs *SCaMC3*-KO y los MEFs *ADCK2*-HT, la utilización de H_2O_2 como agente inductor del PTP produce una mayor toxicidad en los MEFs *Gdap1*-KO. Cuando evaluamos el $\Delta\Psi_{mit}$, la adición de H_2O_2 (0.5mM) induce una caída del $\Delta\Psi_{mit}$ en los controles WT que es ligeramente mayor en los MEFs *GDAP1*-KO. Los valores del $\Delta\Psi_{mit}$ tras la adición de H_2O_2 fueron de: $34.39 \pm 10.07\%$ y $52.89 \pm 12.07\%$, en los MEFs WT y *Gdap1*-KO, respectivamente (Fig. 28A y 28C). Esta toxicidad del H_2O_2 se debe efectivamente a la mayor sensibilidad a la apertura del PTP, ya que se reduce significativamente en presencia de CsA: el $\Delta\Psi_{mit}$ es del $85.45 \pm 17.11\%$ en los controles WT y del $101.92 \pm 24.03\%$ en los MEFs *Gdap1*-KO (Fig. 28B y 28C). Por otro lado, la adición de 0.5 mM H_2O_2 induce una muerte que es significativamente superior en los MEFs *Gdap1*-KO a las 3.5h: la adición de 0.5 mM H_2O_2 provoca una muerte del $32.48 \pm 2.41\%$ en los MEFs WT y del $58.86 \pm 4.76\%$ en los MEFs *Gdap1*-KO (Fig. 28D). La menor supervivencia de los MEFs *Gdap1*-KO no se observa sin embargo con el tratamiento con estaurosporina, un agente inductor de muerte que no implica a la mitocondria ($88.77 \pm 1.89\%$ en los WT y $86.67 \pm 1.78\%$ en los MEFs *Gdap1*-KO) (Fig. 28D), descartando una mayor susceptibilidad generalizada a estímulos de muerte.

Estos resultados sugieren que a pesar de que a priori la ausencia de GDAP1 no parece causar un peor estado bioenergético basal, si genera un estado “PTP prone” en la mitocondria que podría estar causando una menor capacidad de hacer frente a gastos energéticos elevados en respuesta a estímulos puntuales. Esto podría estar asociado con la patología de Charcot-Marie-Tooth.

(página siguiente) **FIGURA 28. Los MEFs procedentes de ratones *Gdap1*-KO son más sensibles a agentes inductores del PTP.** (A, B) Experimentos representativos para el tratamiento con H_2O_2 0.5 mM en ausencia (A) o presencia de CsA 1.5 μ M (B). (C) Potencial de membrana mitocondrial normalizado respecto a los valores basales 10 min después de la adición de H_2O_2 0.5 mM, en ausencia o presencia de CsA 1.5 μ M. Se analizaron un total de 21 células de al menos 3 experimentos independientes. (D) Porcentaje de muerte tras el tratamiento

estaurosporina (STS 5 μM), ciclosporina A (CsA 1.5 μM), H_2O_2 (0.5 mM), ó H_2O_2 + CsA (0.5 mM + 1.5 μM) durante 3.5 h. Se analizaron más de 8 ensayos de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, test de Student pareado de dos colas.



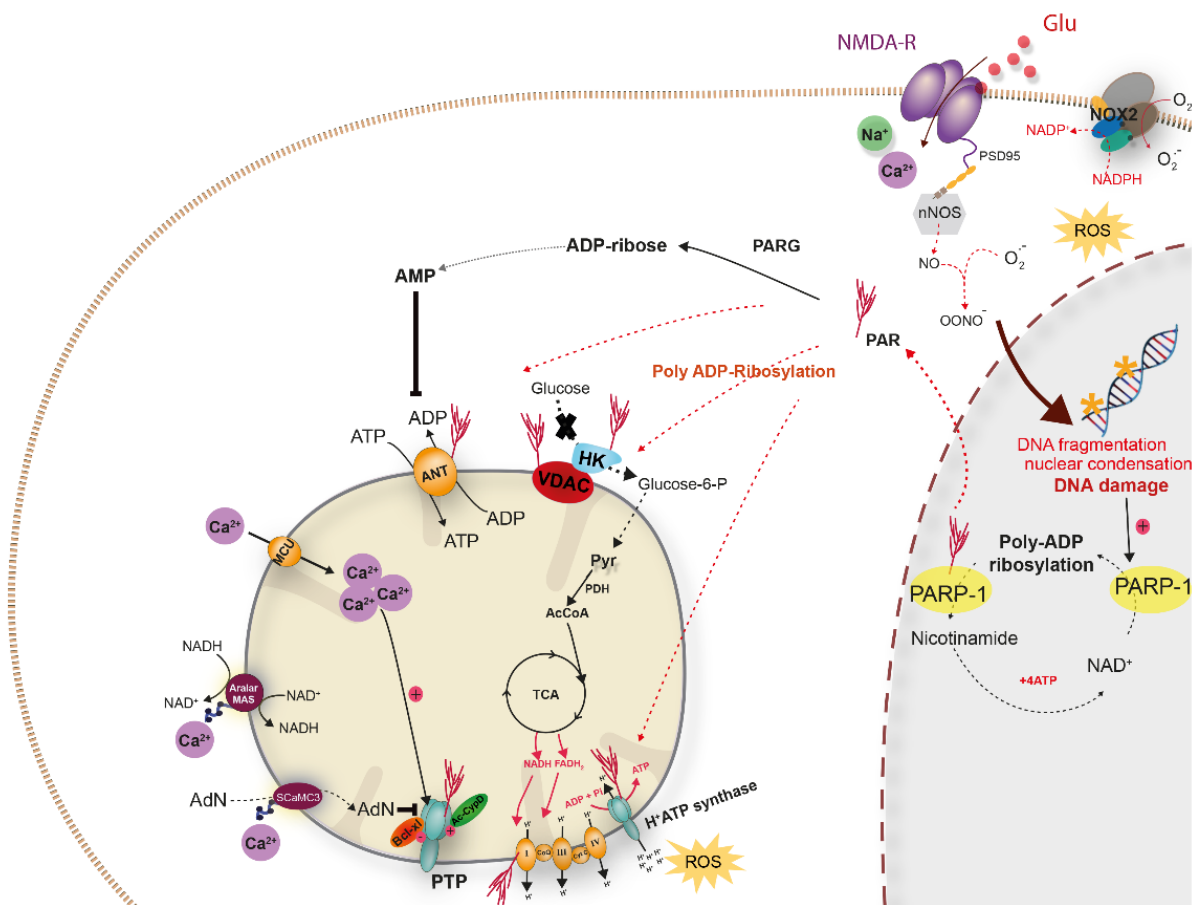
4. CARACTERIZACIÓN DE LA SENSIBILIDAD NOCICEPTIVA EN LOS RATONES DOBLES *SCaMC-3* / *Gdap1*

En conjunto, los resultados anteriores nos permiten concluir que los ratones *Gdap1*-KO presentan un fallo en la sensibilidad nociceptiva y mecánica a nivel periférico, lo que sin embargo no excluye defectos en niveles superiores del sistema nervioso central, como el cerebelo. Este fallo en la transmisión de la sensibilidad parece estar causado por la alteración de diversos mecanismos de señalización por calcio en las neuronas de ganglios de raíz dorsal, y por una deficiencia energética mitocondrial manifestada en un menor $\Delta\psi$, menor respuesta respiratoria a algunos estímulos, menor llegada de Ca a la mitocondria de la neurita, que podría comprometer su correcta función y transmisión sináptica.

Resultados previos de nuestro laboratorio han demostrado que la actividad del transportador mitocondrial *SCaMC-3*/*Slc25a23*, un transportador $\text{ATP-Mg}^{2+}/\text{Pi}$ regulado por Ca^{2+} , aumenta la capacidad de retención de Ca^{2+} en la mitocondria (Amigo et al., 2013, Rueda et al., 2015) y

previene frente a la apertura del PTP contrarrestando los daños por excitotoxicidad en modelos neuronales (Rueda et al., 2015) (ver esquema 2 a continuación). Esta función se aprecia cuando el estímulo (glutamato/NMDA) activa PARP-1, lo que conduce a una caída del ATP mitocondrial contrarrestanda por SCaMC-3, que transporta ATP citosólico a la mitocondria (Rueda et al., 2015, Rueda et al., 2016), pero no con estímulos que no activan PARP-1.

Según esta hipótesis, el aumento en la actividad de SCaMC-3 podría contrarrestar también la disfunción bioenergética causada por la ausencia de GDAP1 que parece estar comprometiendo la correcta transmisión sináptica en los ratones *Gdap1*-KO.



ESQUEMA 2. La activación de PARP-1 promueve la disfunción mitocondrial. La producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de nitrógeno (RNS) bajo la activación tónica de los receptores de NMDA promueve: 1) el daño en el DNA y la activación de PARP-1 en el núcleo, 2) la generación de polímeros de poli(ADP-ribosa) (PAR), y 3) la ribosilación poli-ADP-ribosa de proteínas, incluyendo hexoquinasa 1 (HK), H⁺ ATP sintasa, ATP-ADP translocasa (ANT) y diferentes complejos de la cadena transportadora de electrones (ECT). La ribosilación poli-ADP-ribosa de HK1 impide la correcta entrada de sustratos a la mitocondria lo que, junto con la disfunción de ANT y ETC, resulta en una disminución de la función mitocondrial. Los polímeros PAR son generados a partir de las proteínas poli-ADP-ribosiladas por la PAR glucohidrolasa (PARG) y por catabolitos *downstream* incluyendo AMP que pueden bloquear la función de ANT. En este contexto se puede producir la apertura del poro de transición de permeabilidad (PTP), de modo que el equilibrio entre inductores (Ca²⁺ de la matriz mitocondrial, acetilación de

ciclofilina D (CypD), etc.) e inhibidores (adenín nucleótidos (AdN), Bcl-XI no fosforilado, etc.) determinará el que se produzca o no la apertura del PTP y la disfunción mitocondrial.

Como prueba de concepto hemos generado un modelo murino *SCaMC-3 / Gdap1* para testar si el doble KO presenta un empeoramiento en el fenotipo que muestran los ratones *Gdap1*-KO. Hemos realizamos pruebas de comportamiento *in vivo* usando cuatro grupos de ratones (6-10 machos/grupo) desde 5 hasta 7 meses.

De nuevo, se estudió en primer lugar la sensibilidad de los ratones *Gdap1*-KO ante estímulos térmicos nocivos utilizando el *plantar test* o test de Hargreaves (Hargreaves et al., 1988). La figura 29 los tiempos de respuesta (latencia) de los ratones a los dos tipos de test, nociceptivo térmico (Fig. 29A y 29B) y motor (Fig. 29C y 29D). En todos ellos se manifiesta una mejora del comportamiento con el tiempo (edad), disminuyendo el tiempo de respuesta en los primeros y aumentando en los segundos. En el *plantar test*, el análisis del genotipo muestra los siguientes tiempos de respuesta: *SCaMC3*-WT / *Gdap1*-WT 6.024 ± 0.568 segundos, *SCaMC3*-KO / *Gdap1*-WT 5.014 ± 0.511 s, *SCaMC3*-WT / *Gdap1*-KO 10.425 ± 0.395 s, y *SCaMC3*-KO / *Gdap1*-KO 8.793 ± 0.511 s. El análisis post hoc (test de Tukey) no muestra diferencias significativas en el tiempo de respuesta respecto a la edad, aunque como hemos comentado previamente se observa una tendencia general a mejorar con la edad.

Los paneles 29A y 29B muestran la influencia de la dosis de *SCaMC-3* en el comportamiento de los ratones WT (Fig. 29A) o KO (Fig. 29B) para *GDAP1*. En ambos casos, la falta de *SCaMC-3* parece mejorar la sensibilidad nociceptiva en el *plantar test*, sobre todo en la tercera sesión en la que fue medida (a los 7 meses). En el caso de los ratones *Gdap1*-KO (Fig. 29B), todos ellos mostraron menor sensibilidad nociceptiva (mayor tiempo de respuesta) que los WT (Fig. 29A), pero la ausencia de *SCaMC-3* (doble KO de *Gdap1* y *SCaMC3*, Fig. 29B, línea marrón claro) disminuyó ese tiempo de respuesta, sobre todo a los 7 meses, aunque los resultados no tuvieron significado estadístico.

En el caso del comportamiento motor en el rota-rod, la figura 29C muestra que la ausencia de *SCaMC-3* produjo una mejora en el mismo (mayor tiempo de latencia de *SCaMC3*-KO que el WT, comparar línea verde oscura con verde clara). Los ratones *Gdap1*-KO (Fig. 29D) mostraron un comportamiento motor claramente peor que los WT (Fig. 29C) pero la ausencia de *SCaMC-3* mejoró el comportamiento de los *Gdap1*-KO de forma significativa (Fig. 29D). Así, los ratones doble KO, *Gdap1* y *SCaMC3* (Fig. 29D, línea marrón clara), tuvieron mejor comportamiento que los KO solo de *Gdap1* (Fig. 29D, línea marrón oscuro). El análisis del

genotipo muestra los siguientes tiempos de latencia: *SCaMC3-WT / Gdap1-WT* 198.037 ± 10.569 segundos, *SCaMC3-KO / Gdap1-WT* 254.604 ± 9.499 s, *SCaMC3-WT / Gdap1-KO* 153.441 ± 7.358 s, y *SCaMC3-KO / Gdap1-KO* 246.645 ± 9.499 s.

Todo ello sugiere que cada uno de estos factores (GDAP1 y SCaMC-3) tienen efectos contrapuestos y aditivos en el test motor. Por lo tanto, estos resultados no son consistentes con la hipótesis de que los niveles de SCaMC-3 mejoren el fenotipo de los ratones *Gdap1-KO*.

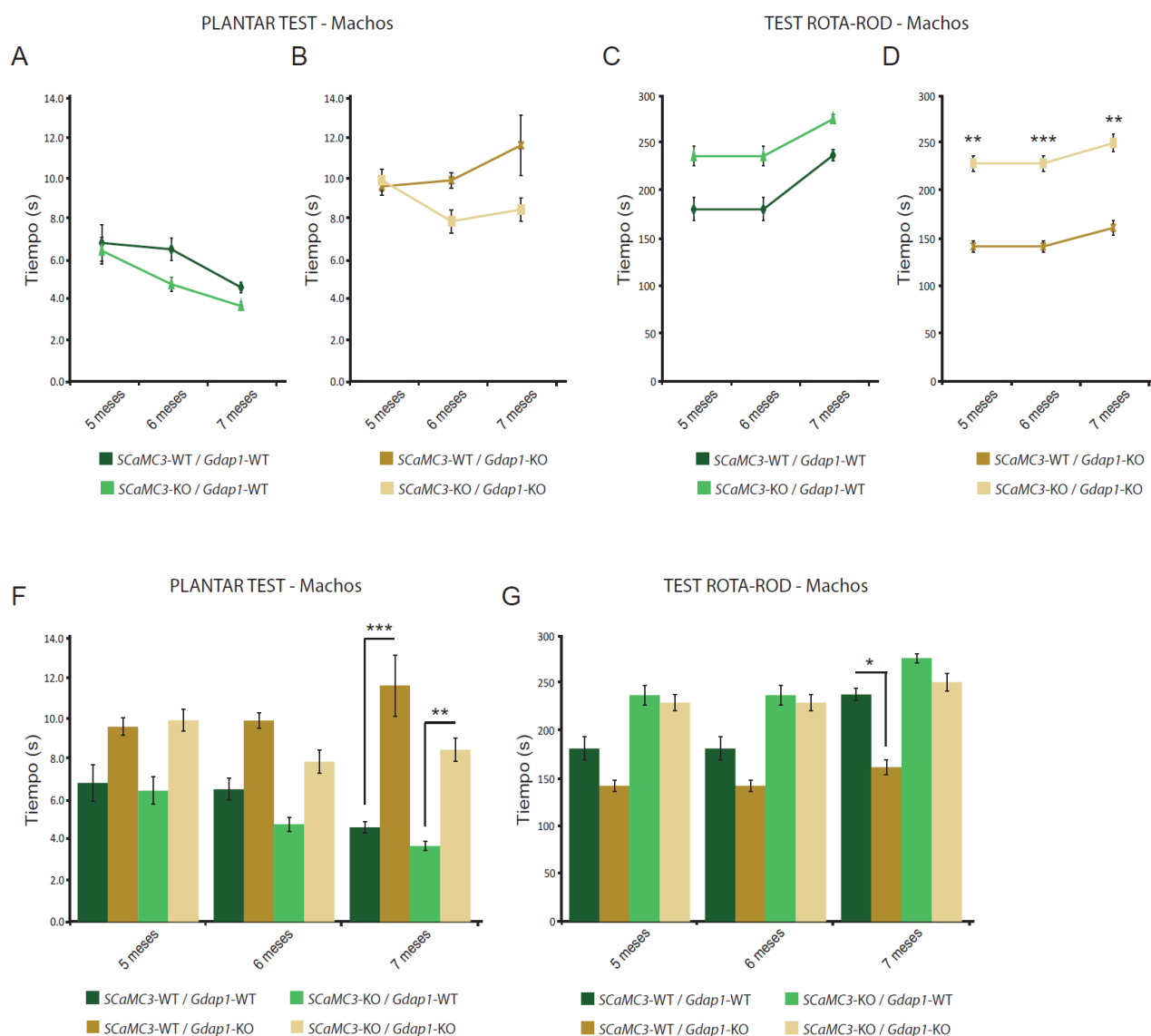


FIGURA 29. Ensayos de comportamiento *in vivo* en ratones dobles *SCaMC-3 / Gdap1*. (A, B, F) Tiempos de respuesta (en segundos) para plantar test, machos de 5 a 7 meses ($n = 6-10$ machos/genotipo). (C, D, G) Latencia de caída (tiempo en segundos) para test rota-rod, machos de 5 a 4 meses ($n = 6-10$ machos/genotipo). Los datos están expresados como media \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ANOVA de tres factores (latencia de caída, genotipo y edad) con medidas repetidas (distintos ensayos en el mismo ratón), usando el genotipo y la

edad como factores inter-sujetos y los distintos tiempos de latencia como el factor intra-sujetos. Test post hoc Tukey (Ruiz-Medina et al., 2013).

DISCUSIÓN

1. NOCICEPCIÓN EN LA ENFERMEDAD DE CHARCOT-MARIE-TOOTH Y EN EL RATÓN *Gdap1-knock out* (*Gdap1-KO*)

La pérdida de sensibilidad es una de las características clásicas de la enfermedad de Charcot-Marie-Tooth (CMT) (Skre, 1974, Martyn and Hughes, 1997). La enfermedad de CMT tiene muchos subtipos y se han identificado más de 40 genes/loci asociados, con mayor o menor grado de implicación sensitiva. Sin embargo, debido a que los síntomas motores tienen mayor impacto en la calidad de vida del paciente, hay menos estudios que evalúen específicamente la pérdida de sensibilidad asociada a la enfermedad (Ericson and Borg, 1999).

Uno de los primeros estudios sobre la función sensitiva, en pacientes con CMT-1 y CMT-2, analizó los umbrales térmico, térmico nociceptivo y vibratorio, en manos y pies (Ericson and Borg, 1999). Se estudiaron 10 pacientes que, comparados con grupos control, presentaban umbrales significativamente mayores para la temperatura, el dolor térmico y la vibración en manos y pies de modo más prominente en las extremidades inferiores (Ericson and Borg, 1999). Posteriormente, Sevilla y colaboradores analizaron en 9 pacientes de 8 familias que presentaban mutaciones en *GDAP1* y cuyo análisis electrofisiológico (estudios de velocidad de conducción) demostró que sufrían un CMT2 (de tipo axonal). Estos pacientes mostraron una pérdida de sensación ante estímulos tipo pinchazos, vibración, tacto y posición en los miembros inferiores, y disminución de la sensación de pinchazos, vibración, tacto y posición en los miembros inferiores, y disminución de la sensibilidad ante los mismos estímulos para los miembros superiores (Sevilla et al., 2008). En línea con dichas observaciones, nuestros resultados muestran que los ratones *Gdap1-KO* presentan mayores umbrales nociceptivos térmico y mecánico, indicando un déficit en la sensibilidad nociceptiva. Además, al igual que sucede en la enfermedad humana de CMT, el fallo en la transmisión nociceptiva parece encontrarse a nivel de la aferencia primaria. Si bien no hemos encontrado alteraciones en las terminales nerviosas libres, los estudios de electrofisiología mostraron un aumento en el umbral de respuesta a estímulos mecánicos en las fibras A δ y C y mecano-sensibles en los ratones *Gdap1-KO*.

Por otro lado, una serie de estudios postulan que la presencia de dolor en algunos pacientes de CMT es consecuencia de daños en fibras sensoriales y que, por lo tanto, se trataría de un tipo de dolor neuropático, es decir, el que resulta de un daño/lesión y afecta al sistema somatosensorial. Sin embargo, los resultados de estos estudios son poco concluyentes: en algunos se trata de resultados obtenidos simplemente mediante el uso de cuestionarios (Padua

et al., 2008), o no se puede establecer una relación entre la sensación del dolor y la enfermedad (Laura et al., 2014). En cualquier caso, en estos estudios también se describieron umbrales de detección a estímulos térmicos más elevados (Laura et al., 2014) y menores respuestas a estímulos nociceptivos (Pazzaglia et al., 2010) en los pacientes de CMT. En conclusión esta serie de estudios también están en línea con nuestras observaciones en ratones *Gdap1*-KO, dado que éstos mostraron menor sensibilidad nociceptiva térmica y mecánica, pero en ningún caso mostraron signos de hiperalgesia.

El modelo murino de CMT asociado a GDAP1 utilizado en este estudio se ha generado eliminando el exón 1 del gen, resultando en un buen modelo para estudiar la enfermedad de CMT asociada a *Gdap1*, con diversas alteraciones en neuronas sensitivas e importantes déficits motores y electrofisiológicos (Barneo-Munoz et al., 2015). Otro modelo murino *Gdap1*^{-/-} no muestra diferencias significativas entre animales mutantes y control en estudios sensitivos y motores hasta los 13 meses, lo que no descarta fallos a edades más avanzadas (Niemann et al., 2014). Si se han observado en este ratón alteraciones electrofisiológicas a edades más avanzadas, junto con cambios en la morfología mitocondrial y defectos en el transporte mitocondrial en neuronas DRGs. Estos autores sugieren que estos cambios del ratón podrían darse también en los pacientes de CMT y acumularse durante la primera década de la vida en los axones largos de los nervios periféricos de los pacientes de CMT (Niemann et al., 2014). Todo esto coincide con los resultados obtenidos en nuestro estudio que muestran una tendencia a que el fenotipo, tanto sensitivo como motor, empeore con el tiempo. Las diferencias observadas entre ambos modelos murinos respecto a la edad de aparición de los síntomas pueden deberse al diferente fondo genético de los ratones además de que el ratón de Niemann y colaboradores se generó de manera distinta (eliminado el exón 5 del gen).

El fallo en la sensibilidad nociceptiva parece localizarse a nivel de la neurona periférica, aunque no se pueden excluir defectos en niveles superiores del sistema nervioso central. Por ejemplo, el cerebelo es la región del cerebro del ratón con mayores niveles de GDAP1 (Niemann et al., 2005), y resultados de Barneo-Muñoz y colaboradores han mostrado alteraciones en el ratón *Gdap1*-KO particularmente en esa región (Barneo-Munoz et al., 2015).

Nuestros resultados en neuronas de ganglios de raíz dorsal (DRGs) muestran alteraciones en la señalización nociceptiva por calcio. Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO muestran mayores señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ tras la activación del receptor TRPV1 con capsaicina. La activación del receptor TRPV1 produce fundamentalmente una entrada de Ca^{2+} al citosol, generando una despolarización del terminal e iniciando distintas cascadas de señalización que llevan a la

liberación de neurotransmisores, como glutamato, sustancia P y CGRP (Zhao and Tsang, 2017). Por lo tanto, mayores señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit.}}$ tienen como consecuencia a su vez una mayor liberación del neurotransmisor glutamato, como vemos en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO.

Estos resultados podrían deberse a que en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO haya más receptores TRPV1.

Otra posibilidad es que los mayores niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit.}}$ en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO evocados por capsaicina se deban a un defecto en el tamponamiento del Ca^{2+} por parte del retículo endoplásmico (RE). Efectivamente Medvedeva y colaboradores (Medvedeva et al., 2008) sostienen que el RE es capaz de tamponar en las terminales presinápticas pequeñas cantidades de calcio inducidas por trenes cortos de potenciales de acción. Esta posibilidad es consistente con la reducción en el contenido de Ca^{2+} del RE y de la salida de Ca^{2+} del RE que se observa en las neuronas *Gdap1*-KO tras la adición de tapsigargina (inhibidor no competitivo de la Ca^{2+} ATPasa del retículo sarcoendoplásmico, SERCA) (ver Figura 4 de Resultados).

El receptor TRPV1 está modulado negativamente por calcio, de modo que los canales TRPV1 sufren un proceso de desensibilización dependiente de Ca^{2+} (Koplas et al., 1997, Nita et al., 2016). El control de los niveles de Ca^{2+} citosólico locales cercanos al canal TRPV1 es imprescindible para evitar la inactivación dependiente de Ca^{2+} del receptor, y permitir la propagación de la señal nociceptiva (Nita et al., 2016).

De modo que podría postularse que a nivel celular en las DRGs (de ratones P1-P2) una estimulación del receptor produce inicialmente mayores niveles de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit.}}$, que a su vez produce una mayor liberación de glutamato, y esto puede deberse a un mal tamponamiento por parte del RE del Ca^{2+} entrante a través del receptor. A largo plazo (en ratones adultos, como los usados en los tests conductuales) esto se traduciría en un proceso de desensibilización en los ratones *Gdap1*-KO debido a la inhibición dependiente de Ca^{2+} que sufre el receptor TRPV1.

2. ENTRADA DE CALCIO OPERADA POR DEPÓSITO (SOCE)

Los canales de entrada de calcio operada por depósito o SOCE se han relacionado con varias condiciones patológicas como la enfermedad de Alzheimer (Popugaeva and Bezprozvanny, 2013) o la epilepsia (Steinbeck et al., 2011). También se ha visto que un aumento en la actividad SOCE es perjudicial en neuronas del estriado de varios modelos de la enfermedad de

Huntington (Wu et al., 2016, Czeredys et al., 2013, Chen et al., 2011, Wu et al., 2011). Por otro lado, en células de neuroblastoma SH-SY5Y el tratamiento con neurotoxina 1 (MPP⁺) disminuye los niveles de TRPC1, aumenta la muerte neuronal, produce la pérdida del SOCE, reduce los niveles de Ca²⁺ del RE, e induce la respuesta de las proteínas mal plegadas (UPR) (Selvaraj et al., 2009, Bollimuntha et al., 2005, Selvaraj et al., 2012).

2.1. SOCE y *Gdap1*

Varios estudios han demostrado que la disminución de los niveles de GDAP1 (*GDAP1*-knockdown, *GDAP1*-KD) en células humanas de neuroblastoma SH-SY5Y produce un defecto en el mecanismo SOCE. Las células *GDAP1*-KD (Pla-Martin et al., 2013) y las motoneuronas (Barneo-Munoz et al., 2015) provenientes de ratones *Gdap1*-KO tienen una actividad SOCE reducida y menor entrada de Ca²⁺ por SOCE. Asimismo, las células *GDAP1*-KD muestran una reducción en la entrada de Ca²⁺ a la mitocondria debida al SOCE. Este fallo no se debía a un defecto intrínseco del tamponamiento de calcio por parte de la mitocondria, sino a una localización defectuosa de la mitocondria hacia regiones subplasmalema cercanas. Por lo tanto, la reducción en la actividad SOCE en las células *GDAP1*-KD se atribuyó a la inactivación inducida por Ca²⁺ del SOCE debido a la falta de tamponamiento de Ca²⁺ por las mitocondrias cercanas (Pla-Martin et al., 2013, Gonzalez-Sanchez et al., 2017). Por otro lado, diferentes mutaciones de *Gdap1* asociadas a la enfermedad de CMT tienen efectos distintos sobre la actividad SOCE (Gonzalez-Sanchez et al., 2017), la dinámica mitocondrial, y el estrés oxidativo y la apoptosis (Niemann et al., 2009) dependiendo del tipo de mutación.

También es interesante que la sobreexpresión de juntofilina 1 (JPH1) es capaz de restaurar la actividad SOCE en las células silenciadas para GDAP1 (Pla-Martin et al., 2015). JHP1 es una proteína que se localiza en el RE en los complejos de membranas asociadas con la mitocondria (MAM) (así como GDAP1 en la parte mitocondrial), pero que se relocaliza durante la activación del SOCE para co-localizar con STIM1 en las uniones RE-membrana plasmática. Sorprendentemente, aunque los inhibidores mitocondriales producen una severa inactivación del SOCE en células control, la actividad del SOCE en células que sobreexpresan JHP1 no es inhibida por los mismos, lo que indica que la recuperación de la actividad SOCE gracias a JPH1 en las células deficientes en GDAP1 no está relacionada con la recuperación de la distribución o función mitocondrial (Pla-Martin et al., 2015).

Nuestros resultados muestran que las neuronas DRGs y las neuronas cerebelares *Gdap1*-KO tienen una menor actividad SOCE. Sin embargo, resultados obtenidos por Paloma González Sánchez indican que, a diferencia de neuroblastoma, la captura de calcio por la mitocondria no tiene influencia sobre el SOCE neuronal (Gonzalez-Sanchez, 2017). Por lo tanto, la menor actividad SOCE en las neuronas *Gdap1*-KO no puede asociarse a una mala localización de las mitocondrias KO, y podría deberse a una menor salida de Ca^{2+} del RE, consistente con la menor cantidad de Ca^{2+} del RE en este modelo.

Tanto en DRGs como en neuronas cerebelares, esta reducción en la actividad SOCE tiene un efecto particularmente significativo sobre los canales de calcio dependientes de voltaje (VGCCs), medido como señal de Ca^{2+} inducida por despolarización por alto K^+ . La menor actividad del SOCE se acompaña con una estimulación de la actividad de los VGCCs tanto en las neuronas DRGs como en las cerebelares. La relación entre menor SOCE y mayor actividad de los VGCCs es muy clara, puesto que en estado basal la actividad de los VGCCs es inferior en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO respecto a los controles.

Utilizando distintos inhibidores del SOCE hemos demostrado además que el tratamiento de neuronas control DRGs y cerebelares con 2-APB, reproduce la reducción en la actividad del SOCE asociada a la estimulación de los receptores VGCCs de las neuronas *Gdap1*-KO. Este inhibidor del SOCE actúa también sobre los receptores IP_3 inhibiendo de la salida de Ca^{2+} del RE, lo que promovería probablemente una menor activación de STIM1 y por consiguiente menor SOCE y mayor actividad de los VGCCs. Esto no ocurre con el otro inhibidor empleado, YM-58483, que no actúa sobre los receptores IP_3 (He et al., 2005) (ver Figuras 8 y 9 de Resultados). Todo esto sugiere que el menor SOCE de las neuronas *Gdap1*-KO (tanto DRGs como cerebelares) se debe, al menos en parte, a una menor movilización de Ca^{2+} del RE y tal vez una menor activación de STIM1 que permitiría una menor inactivación por STIM1 en la membrana de los VGCCs $\text{Ca}_v1.2$ y $\text{Ca}_v3.1$ (Wang et al., 2010, Park et al., 2010, Nguyen et al., 2013).

Los niveles basales de Ca^{2+} del RE de terminales sinápticos son aproximadamente de 150 μM (de Juan-Sanz et al., 2017), variando según los tipos celulares. De Juan-Sanz y colaboradores han demostrado que en neuronas de hipocampo la inhibición de la entrada de Ca^{2+} al RE, que desencadena un vaciamiento del Ca^{2+} del RE, reduce las señales de Ca^{2+} presinápticas, probablemente asociadas a canales dependientes de voltaje, y la exocitosis de glutamato en las terminales nerviosas en respuesta a potenciales de acción (AP). Esto no se debe a que el RE actúe como fuente de Ca^{2+} en el potencial de acción, ya que la actividad

presináptica causa que el RE actúe tamponando localmente el Ca^{2+} . Estos autores determinaron que en las terminales nerviosas está ya presente STIM1 en la membrana plasmática, y su presencia aumenta con el vaciamiento de Ca^{2+} del RE. En estado de reposo, STIM1 y también STIM2 (Berna-Erro et al., 2009, Brandman et al., 2007) están presentes en la membrana plasmática de las terminales nerviosas y ejercerían su doble función de activar basalmente el SOCE, como se sabe que ocurre en neuronas (Samtleben et al., 2015) e inhibir la entrada de Ca^{2+} por potenciales de acción (de Juan-Sanz et al., 2017) por un mecanismo posiblemente relacionado con la interacción de STIM1 o STIM2 con los VGCCs $\text{Ca}_v1.2$ (un subtipo de canal VGCC tipo L) (Wang et al., 2010, Park et al., 2010) y $\text{Ca}_v3.1$ (un subtipo de canal VGCC tipo T) (Nguyen et al., 2013). Cuanta mayor sea la presencia de STIM2 y de STIM1 en la membrana plasmática (lo que a su vez, se relaciona con los niveles de Ca^{2+} del RE), menor será la respuesta a un vaciado abrupto del RE como el que activa el SOCE de gran amplitud. Es decir, si hay poco Ca^{2+} en el RE, la respuesta SOCE no será tan grande (Berna-Erro et al., 2009) y la inhibición de los canales de Ca^{2+} causada por la localización en la membrana plasmática de las moléculas STIM1 y STIM2 residentes en el RE será menor. Estos resultados explican los hallazgos sobre la interacción SOCE-VGCCs en neuronas *Gdap1-KO*. Puesto que es improbable que tal interacción de STIM1/2 con los VGCCs ocurra en la zona activa de la sinapsis, sería necesario que los canales VGCCs fueran los suficientemente móviles para acceder a las uniones RE-membrana plasmática para permitir que la activación de STIM cause la inhibición de la entrada de Ca^{2+} por este mecanismo. Esta posibilidad está apoyada por estudios recientes que indican que los canales $\text{Ca}_v2.1$ y $\text{Ca}_v2.2$ son móviles y no residen exclusivamente en la zona activa terminal sináptica (Schneider et al., 2015, Heine et al., 2016). De modo que STIM1 activado podría potencialmente “atrapar” estos canales lejanos al sitio de liberación, aumentando la distancia entre los sensores responsables de la liberación de vesículas y los sitios de entrada de Ca^{2+} , e inhibiendo así la liberación de neurotransmisores.

La principal función atribuida al SOCE ha sido la del llenado y mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} del RE (Samtleben et al., 2015, Hartmann et al., 2014, Hooper et al., 2014). Nuestros resultados muestran que efectivamente las neuronas DRGs y cerebelares *Gdap1-KO* tienen menores niveles de calcio del RE. Sin embargo, en el caso de las neuronas, la relación entre SOCE y Ca^{2+} del RE debe ser más compleja, ya que la disminución del SOCE en neuronas no es atribuible a la mitocondria deslocalizada, como sucede en neuroblastoma, sino al menor Ca^{2+} del RE en sí mismo. Es posible que en precursores neuronales deficientes en *GDAP1*, que aún no expresan los canales característicos de neuronas pero si el mecanismo SOCE (Gassmann et

al., 2014, Hao et al., 2014), el fallo en la localización mitocondrial conduzca a una disminución del SOCE y del contenido de Ca^{2+} del RE como el que se aprecia en neuroblastoma (Pla-Martin et al., 2013, Gonzalez-Sanchez et al., 2017). Este menor contenido de Ca^{2+} del RE podría continuarse durante la diferenciación a neuronas y asociarse con menor movilización de proteínas STIM a la membrana ligada a menor actividad SOCE y mayor actividad de los canales de Ca^{2+} como la que se ha encontrado en la presente Tesis Doctoral.

La enfermedad de Charcot-Marie-Tooth afecta a neuritis largas, comienza en los miembros distales y progresa en función de la longitud de éstos (Sevilla et al., 2008). Hemos comprobado que la menor actividad SOCE de neuronas DRGs y cerebelares *Gdap1*-KO es especialmente relevante en las neuritis. También que, aunque la captura de Ca^{2+} por la mitocondria no afecta a la actividad SOCE neuronal (Gonzalez-Sanchez, 2017) su señal puede alcanzar la mitocondria, y las neuronas DRGs y las neuronas cerebelares *Gdap1*-KO muestran menor entrada de calcio a la mitocondria asociada a la menor activación del SOCE, siendo de nuevo el defecto especialmente relevante en las neuritis.

2.2. SOCE, dolor neuropático y dolor crónico

Además de la función clásica del SOCE de llenado y mantenimiento de los niveles de Ca^{2+} del RE, en los últimos años se ha empezado a explorar otras posibles funciones del SOCE en neuronas (Gonzalez-Sanchez, 2017). Por ejemplo, numerosos estudios sugieren que el SOCE podría estar implicado en diferentes procesos de dolor.

Gemes y colaboradores observaron que en un modelo de dolor neuropático (por ligadura del nervio espinal) las neuronas DRGs dañadas mostraban una disminución en los niveles de Ca^{2+} del RE, lo que producía la activación del SOCE como mecanismo compensatorio tras el daño para conseguir mantener los niveles de Ca^{2+} del RE (Gemes et al., 2011).

Los canales SOCE también parecen ser críticos en las respuestas inmunes, enfermedades inflamatorias y dolor crónico (Shaw and Feske, 2012, Shaw et al., 2013). El inhibidor del canal SOCE YM-58483 (BTP2) produce un fuerte efecto analgésico a nivel central (disminuyendo la hipersensibilidad térmica y mecánica) y previene el desarrollo de dolor crónico en ratones (Gao et al., 2013, Xia et al., 2014). De forma similar, YM-58483 revierte los síntomas de la artritis inducida por colágeno: reduce el edema plantar, disminuye la producción periférica de citoquinas inflamatorias, y reduce la activación a nivel de la médula espinal de factores implicados en las rutas de transmisión del dolor (Gao et al., 2015).

En conclusión estos estudios sugieren que el SOCE podría estar implicado en la nocicepción, aunque el mecanismo responsable de esta relación no está completamente claro.

3. FUNCIÓN MITOCONDRIAL: IMPACTO DEL CALCIO DEL RE Y DEL SOCE

Recientemente nuestro grupo ha demostrado que la salida de Ca^{2+} del RE y la entrada de Ca^{2+} a través del SOCE en células de neuroblastoma resulta en una estimulación dependiente de calcio de la respiración mitocondrial (Gonzalez-Sanchez et al., 2017). Además, la reducción en el SOCE y en los niveles de Ca^{2+} de RE causada por mutaciones en GDAP asociadas a la enfermedad de CMT, conducen a una menor estimulación de la respiración, sugiriendo en conjunto posibles limitaciones energéticas que contribuyen a la patogénesis de la enfermedad (Gonzalez-Sanchez et al., 2017).

GDAP1 es una proteína de la membrana mitocondrial externa que juega un papel en la interacción RE-mitocondria. Nuestro estudio de la bioenergética mitocondrial en neuronas carentes de GDAP1, muestra que las neuronas DRGs *Gdap1*-KO tienen menor potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_{\text{mit}}$) basal, y una tendencia no significativa a disminuir la respiración mitocondrial basal, así como la estimulación de la respiración mitocondrial en respuesta a agentes movilizadores de Ca^{2+} . En particular, el tratamiento con capsaicina, agonista del receptor TRPV1, produce una estimulación de la respiración mitocondrial significativamente menor en las neuronas DRGs *Gdap1*-KO. Este conjunto de factores que se observan en neuronas DRGs postnatales podrían exacerbarse en el animal adulto generando la patología sensitiva observada en esta Tesis Doctoral.

Fibroblastos derivados de pacientes con CMT-4A autosómica recesiva presentan niveles de *GDAP1* reducidos, menor concentración de glutatión (GSH) y una disminución $\Delta\Psi_{\text{mit}}$, que parecen estar relacionados con un mayor estrés oxidativo (Noack et al., 2012). También es interesante que el *knock down* de *MFN2*, asociado a casos de CMT2A disminuye el $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ (Pich et al., 2005)

La activación de los canales TRPV1 no sólo está asociada a la nocicepción, sino también a la muerte celular (Chard et al., 1995). La despolarización mitocondrial inducida por Ca^{2+} es una de las características del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP) (Szabadkai

and Duchen, 2008). Y existen estudios que establecen que el PTP ejerce un papel esencial en la muerte celular dependiente de TRPV1 en neuronas sensoriales específicamente (Shin et al., 2003), y en neuronas corticales (Song et al., 2013) y astrocitoma (Stock et al., 2012). Todo ello nos llevó a estudiar su implicación en el modelo murino de CMT debida a deficiencia en GDAP1, utilizando fibroblastos de ratón, encontrándose que presentan un fenotipo “*PTP prone*”, como se discute más adelante.

Se intentó averiguar si la eliminación de SCaMC-3, que también genera un fenotipo *PTP prone*, podría exacerbar la patología sensitiva de los ratones *Gdap1*-KO. El estudio de los ratones dobles KO (GDAP1 y SCaMC3) produjo un resultado negativo, ya que, sorprendentemente, la ausencia de SCaMC-3 mejoraba el fenotipo de los *Gdap1*-KO. Esta observación será objeto de estudios posteriores.

4. EL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD Y ENFERMEDADES MITOCONDRIALES

La alteración en la dinámica mitocondrial conduce a alteraciones en el transporte de las mitocondrias y a la degeneración axonal distal típica de la enfermedad de CMT, aunque con diferente grado de severidad (Niemann et al., 2009). Los resultados presentados en esta tesis demuestran la existencia de disfunciones mitocondriales asociadas a la ausencia de GDAP1. Otros grupos también han descrito anormalidades en la función mitocondrial en biopsias de músculo y piel de pacientes con CMT-2K, en particular una disminución en la actividad del complejo I de la cadena de transporte de electrones (Cassereau et al., 2009). Sin embargo Cassereau y colaboradores (Cassereau et al., 2011b) creían que existían mecanismos adicionales por los cuales las mutaciones en *GDAP1* causarían la disfunción mitocondrial, incluyendo una desregulación del complejo I, producción excesiva de ROS y disminución de la producción de ATP. Uno de estos mecanismos puede ser una mayor propensión a la apertura del poro de transición de permeabilidad o PTP.

La liberación de Ca^{2+} del RE tiene un papel fundamental como mediador de muchos escenarios de muerte celular (Akl and Bultynck, 2013, Giorgi et al., 2008, Mekahli et al., 2011). La salida de Ca^{2+} estimula la apoptosis a través del PTP, lo que causa la liberación de citocromo c y otros factores pro-apoptóticos, y finalmente la activación irreversible de las caspasas

(Carraro and Bernardi, 2016). Además, en el apartado anterior (Respiración mitocondrial: impacto del calcio del RE y del SOCE) comentábamos que la activación de los canales TRPV1 (mayor en el caso de las neuronas DRGs *Gdap1*-KO) también está asociada a la muerte celular (Chard et al., 1995), y que en este proceso de muerte el PTP parece ejercer un papel esencial en neuronas sensoriales (Shin et al., 2003).

Por ello, uno de los objetivos del presente trabajo ha sido estudiar si el poro de transición de la permeabilidad está alterado en la enfermedad de CMT asociada a *Gdap1*. Poner en evidencia esta alteración es difícil por la falta de protocolos establecidos y por la dificultad de obtener muestras correspondientes al sistema afectado (el sistema nervioso), lo que nos condujo en primer lugar a diseñar y validar un sistema experimental que permitiera valorar en fibroblastos de pacientes la susceptibilidad a la apertura del PTP y su posible inclusión en pruebas clínicas con inhibidores del poro. Para ello hemos utilizado fibroblastos murinos de ratón (MEFs) en dos modelos para los que se conoce o sospecha que el PTP está alterado.

Previamente se ha descrito que las mitocondrias *SCaMC3*-KO poseen una menor CRC en ausencia de un defecto bioenergético (Amigo et al., 2013, Rueda et al., 2015), mientras que se ha encontrado una mayor susceptibilidad al PTP en células de pacientes con deficiencia en CoQ₁₀ (Cotan et al., 2011) como la que tiene lugar en *ADCK2*-HT, por lo que MEFs carentes de *SCaMC-3* o heterocigotos para *ADCK-2* constituyen modelos adecuados para ensayar la apertura temprana del PTP en célula intacta. Otros grupos utilizan el método diseñado por Bernardi y colaboradores que consiste en ver la disminución de fluorescencia de la calceína acumulada en las mitocondrias en presencia de CoCl₂ (Bonora et al., 2016, Giaime et al., 2012, Petronilli et al., 1999). Este método en los MEFs se observó que producía una acumulación de calceína fuera de la mitocondria (resultados no mostrados), por lo que decidimos utilizar un protocolo basado en el uso de la sonda TMRM para monitorizar la pérdida de $\Delta\Psi_{mit}$ debida a la apertura del PTP (Zulian et al., 2014).

Los datos obtenidos en respuesta a oligomicina con MEFs *SCaMC3*-KO y *ADCK2*-HT ponen de manifiesto un estado “*PTP prone*” en estos modelos que es similar al que presentan los melanocitos obtenidos de pacientes con distrofia muscular congénita de Ullrich, con miopatía de Bethlem o distrofia muscular de Duchenne (Zulian et al., 2014, Pellegrini et al., 2013). Esos datos son consistentes con lo descrito para MEFs de otros modelos (Nguyen et al., 2011), células de neuroblastoma (Alvarino et al., 2017), o en otros miembros de la familia de *SCaMCs* (Traba et al., 2012). El uso de agentes inductores del poro, como H₂O₂ (Nguyen et al., 2011, Choi et al., 2013, Heusch, 2015, Alvarino et al., 2017, Traba et al., 2012), también

reproduce este comportamiento e induce una mayor muerte que se rescata cuando se inhibe el PTP con CsA (apartado 3.1.5 resultados) y que para el caso de *SCaMC3-KO* se puede relacionar con la mayor excitotoxicidad reportada observada en cerebro (Rueda et al., 2015).

En el caso de *Gdap1*, nuestros resultados demuestran que el PTP está alterado, ya que los MEFs *Gdap1-KO* presentan mayor susceptibilidad a la apertura del PTP y a agentes inductores sin alteraciones basales en la respiración o morfología mitocondriales, resultado en una mayor toxicidad o degeneración que participaría en el desarrollo de la patología. La muerte celular podría disminuirse empleando inhibidores del poro como tratamiento, como ya se está haciendo en el caso de pacientes con distrofias musculares congénitas, en las que la administración de ciclofilina es capaz de mitigar eventos proapoptóticos, previniendo la muerte celular en neuronas, y mejorando la función cognitiva, somatosensorial y muscular (Bernardi and Bonaldo, 2013, Bernardi and Bonaldo, 2008, Merlini et al., 2008, Angelin et al., 2007, Lamarche et al., 2013).

Por lo tanto, podríamos suponer que en la enfermedad de CMT asociada a *GDAP1*, las alteraciones observadas en la señalización del Ca^{2+} entre RE, mitocondria y otros canales de la membrana plasmática, junto con los otros defectos observados, así como la mayor susceptibilidad a una apertura temprana del PTP, causan una disfunción mitocondrial. Esto tiene un impacto en el estado bioenergético de la célula y la transmisión sináptica, y finalmente podría causar una mayor muerte celular.

CONCLUSIONES

1. Los ratones *Gdap1*-KO muestran menor sensibilidad ante estimulación nociceptiva, pero no presentan fallos motores ni alteraciones en las terminaciones nerviosas libres a las edades testadas. El incremento en el umbral mecánico registrado en aferentes nociceptivas parece indicar que este déficit se encuentra a nivel del sistema nervioso periférico, aunque no se pueden excluir defectos en niveles superiores del sistema nervioso central.
2. Las neuronas DRGs *Gdap1*-KO muestran un aumento en las respuestas evocadas por capsaicina, tanto en la señal de calcio como en la liberación de glutamato, respecto de las neuronas DRGs control.
3. La entrada de calcio inducida por alto K^+ (actividad de los canales VGCCs) disminuye en las DRGs en ausencia de GDAP1. Las DRGs *Gdap1*-KO tienen menores niveles de calcio del retículo endoplásmico (RE) y muestran una menor actividad del mecanismo SOCE. Sin embargo, la actividad de los canales VGCCs medida tras la activación del SOCE es mayor en las DRGs *Gdap1*-KO que en controles. El efecto de la ausencia de GDAP1 es mimetizado por inhibidores específicos del SOCE que inhiben la salida de Ca^{2+} del RE. Una menor movilización de los sensores de calcio del RE (STIM1/2) hacia la membrana plasmática tendría un efecto dual: menor activación del SOCE y menor inhibición de los canales VGCCs. Estos defectos se ven también en neuronas cerebelares *Gdap1*-KO.
4. La menor actividad SOCE de las neuronas DRGs y cerebelares *Gdap1*-KO es especialmente relevante en las neuritas.
5. Las DRGs *Gdap1*-KO muestran menor entrada de calcio a la mitocondria asociada a la menor activación del SOCE, siendo el defecto especialmente relevante en las neuritas. Además tienen menor $\Delta\psi$ basal, una tendencia a disminuir la respiración mitocondrial basal y menor estimulación de la respiración mitocondrial en respuesta a agentes movilizadores de Ca^{2+} del RE y capsaicina. El menor contenido de Ca^{2+} del RE puede estar relacionado con una disfunción mitocondrial causante de un menor $\Delta\psi$, respiración basal y defectos energéticos.
6. Los fibroblastos murinos de ratón (MEFs) procedentes de ratones *SCaMC3*-KO tienen menor capacidad de retención de calcio en mitocondrias, son más susceptibles a la apertura del PTP y a agentes inductores del PTP, sin presentar alteraciones en la respiración, $\Delta\psi$ y morfología mitocondrial. Los MEFs *ADCK2*-HT y *Gdap1*-KO son más susceptibles a la

apertura del PTP y a agentes inductores del PTP, sin presentar alteraciones en el $\Delta\psi$ y morfología mitocondrial. Los MEFs *Gdap1*-KO además no presentan alteraciones en la respiración mitocondrial.

7. El sistema experimental desarrollado permite detectar eficazmente en los modelos celulares utilizados un estado “*PTP prone*” en la mitocondria que podría contribuir al proceso patológico. En el caso de GDAP1, igual que en los otros modelos, la ausencia de la proteína no parece causar un peor estado bioenergético basal en MEFs, pero si genera un estado de susceptibilidad al PTP que podría estar causando una menor capacidad de hacer frente a gastos energéticos elevados en respuesta a estímulos puntuales, lo que podría estar asociado con la patología de Charcot-Marie-Tooth.

8. La caracterización de la sensibilidad nociceptiva en los ratones dobles *SCaMC-3 / Gdap1* muestra que cada uno de estos factores (GDAP1 y SCaMC-3) tienen efectos contrapuestos y aditivos en los tests de comportamiento. Por lo tanto, la ausencia de SCaMC-3 no empeora el fenotipo de los ratones *Gdap1*-KO.

ANEXO

RESULTADOS SUPLEMENTARIOS

2. ESTUDIO DEL MECANISMO MOLECULAR RESPONSABLE DE LAS ALTERACIONES EN LA TRANSMISIÓN SENSITIVA EN LOS RATONES *Gdap1*-KO

2.1 MECANISMOS DE SEÑALIZACIÓN CELULAR MEDIADOS POR CALCIO

2.2.3 Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas DRGs y neuronas cerebelares

Como comentábamos en los resultados, en las neuronas de cerebelo se realizó un estudio más exhaustivo del mecanismo responsable de la menor activación del SOCE en ausencia de GDAP1. Se analizó el efecto sobre el propio mecanismo SOCE y las consecuencias que esto tiene en relación a la actividad de los VGCCs no sólo en neuronas WT, sino también en neuronas *Gdap1*-KO. Además se utilizaron otros inhibidores del SOCE, aparte del 2-APB e YM-5848, considerados menos específicos: los iones trivalentes de La^{3+} y Gd^{3+} .

Recordemos que el 2-APB es un antagonista no competitivo de los receptores IP_3 que presenta un efecto bimodal dependiente de dosis, con una fuerte estimulación de la corriente I_{CRAC} y del SOCE a bajas concentraciones ($<5 \mu\text{M}$) y un aumento transitorio seguido de una inhibición a altas concentraciones ($>20 \mu\text{M}$). Para las neuronas cerebelares hemos testado dos concentraciones superiores al límite establecido de $20 \mu\text{M}$ para asegurarnos un efecto inhibitorio del SOCE: $50 \mu\text{M}$ y $70 \mu\text{M}$ (Figura Suplementaria 1A). Al igual que en las neuronas cerebelares WT, en las *Gdap1*-KO se observa una disminución significativa de la entrada de Ca^{2+} asociada al SOCE a las concentraciones de $50 \mu\text{M}$ y $70 \mu\text{M}$, que no es dependiente de dosis: un 17.15% y de un 14.42% para las concentraciones de $50 \mu\text{M}$ y $70 \mu\text{M}$, respectivamente (Fig. S1C). Esta inhibición de la actividad del SOCE tiene como consecuencia una mayor entrada de Ca^{2+} debido a la acción de los VGCCs, pero este efecto es más claro sólo a la mayor concentración de uso, $70 \mu\text{M}$. Se observa una estimulación de la acción de los VGCCs de un 18.95% para las neuronas *Gdap1*-KO (Fig. S1D) a la concentración de $70 \mu\text{M}$. Efectivamente la razón SOCE/KCl disminuye en las neuronas *Gdap1*-KO pero sólo a la concentración de $70 \mu\text{M}$, se consigue una disminución del 28.51% (a la concentración de $50 \mu\text{M}$ la razón aumenta ligeramente, un 1.81%) (Fig. S1E).

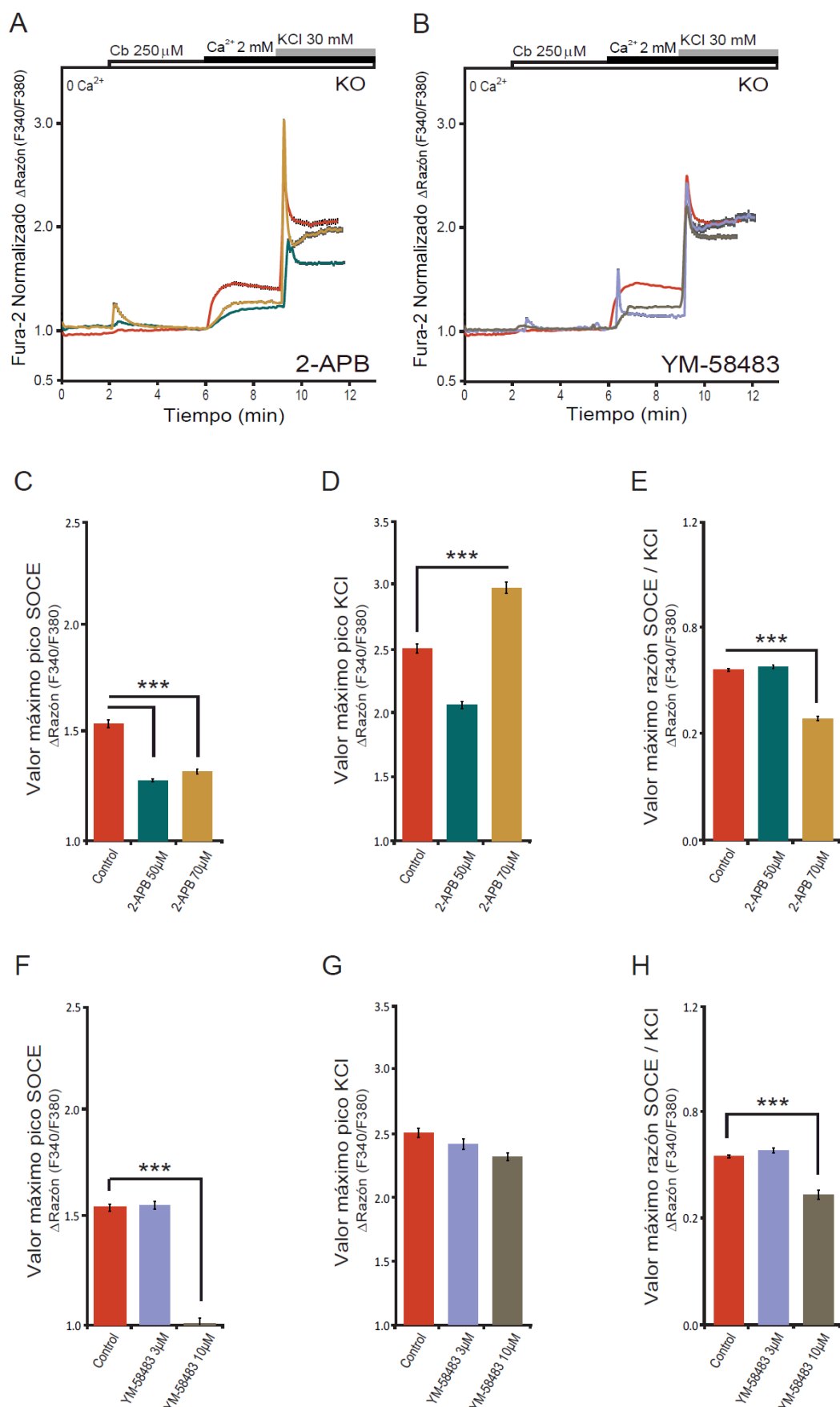


FIGURA S1. Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas cerebelares *Gdap1*-KO.
Determinación de las señales de calcio citosólico ($\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$) en el soma de neuronas cerebelares *Gdap1*-KO mediante

la sonda Fura-2AM. La actividad del mecanismo SOCE se determinó como en experimentos anteriores, añadiendo en este caso al inicio del experimento el inhibidor correspondiente a la concentración indicada. La magnitud de la respuesta SOCE se comparó con la respuesta a la estimulación con KCl 30 mM. **(A-B)** Comparación del efecto de diferentes dosis de los inhibidores 2-APB **(A)** e YM-58483 **(B)**. **(C-E)** Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de 2-APB testadas sobre la actividad SOCE **(C)**, la respuesta a KCl **(D)** y la relación razón SOCE/KCl **(E)**, medido como valor máximo. **(F-H)** Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de YM-58483 testadas sobre la actividad SOCE **(F)**, la respuesta a KCl **(G)** y la relación razón SOCE/KCl **(H)**, medido como valor máximo. Se analizaron más de 100 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, test de Student.

Respecto al compuesto conocido como YM-5848, recordemos que su efectividad varía según la concentración de uso y el modo de aplicación. Hemos testado dos concentraciones, 3 y 10 μ M (Fig. S1B), pero sólo se observa un efecto inhibitorio del SOCE claro a la concentración de 10 μ M: la inhibición es del 35.43% (Fig. S1F).

Sin embargo, con esta dosis no se consigue tampoco una estimulación de la actividad de los receptores VGCCs (Fig. S1G). Aunque no se superen los valores máximos del control de entrada de Ca^{2+} asociada a la despolarización producida por alto K^+ , para la concentración de 10 μ M la razón SOCE/KCl disminuye un 22.74% para las neuronas *Gdapl*-KO (Fig. S1H).

Finalmente, los iones trivalentes de La^{3+} y Gd^{3+} bloquean las corrientes CRAC endógenas con alta afinidad ($K_i = 20\text{-}60$ nM) (Ross and Cahalan, 1995, Yeromin et al., 2004, Aussel et al., 1996). Aunque el uso del La^{3+} como bloqueador del canal CRAC se ve contrarrestado por su habilidad de bloquear también los VGCCs, los canales TRP, así como los PMCA (aunque con mucha menor afinidad), el La^{3+} a bajas concentraciones si es útil para identificar las señales de Ca^{2+} mediadas por el canal CRAC y revelar características estructurales del poro del canal CRAC. Lo mismo sucede con el Gd^{3+} . Diversos estudios sugieren que el mecanismo de acción de los iones trivalentes es un bloqueo del poro del canal CRAC. En el caso del La^{3+} hemos probado un rango de concentraciones desde 10-4000 μ M con resultados dispares (Fig. S2A y Fig. S3A). A concentraciones bajas, como 10 y 100 μ M, la inhibición de la entrada de Ca^{2+} por activación del SOCE se mantiene similar a la del control o disminuye ligeramente: en las neuronas WT un 3.25% para la concentración de 10 μ M (Fig. S2C) y en las neuronas *Gdapl*-KO un 19.60% para la concentración de 100 μ M (Fig. S3C). A estas concentraciones se observa también el consecuente incremento por la entrada de Ca^{2+} a través de los VGCCs: en las neuronas WT un 13.98% y un 9.28% para las concentraciones de 10 y 100 μ M, respectivamente (Fig. S2D), y en las neuronas *Gdapl*-KO un 6.84% para la concentración de 10 μ M (Fig. S3D).

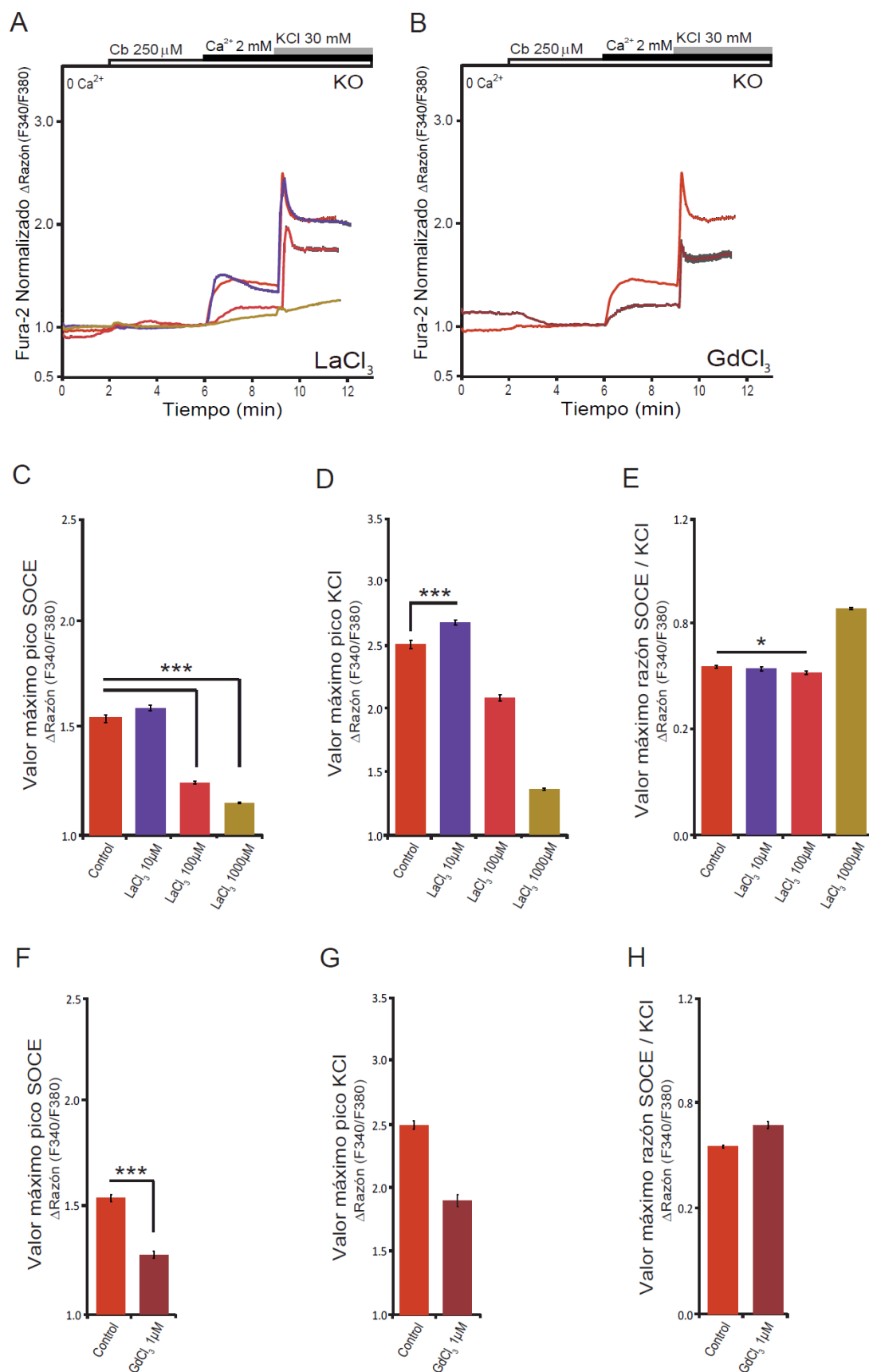


FIGURA S2. Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas cerebelares *Gdap1*-WT. Determinación de las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en el soma de neuronas cerebelares *Gdap1*-WT. La actividad del

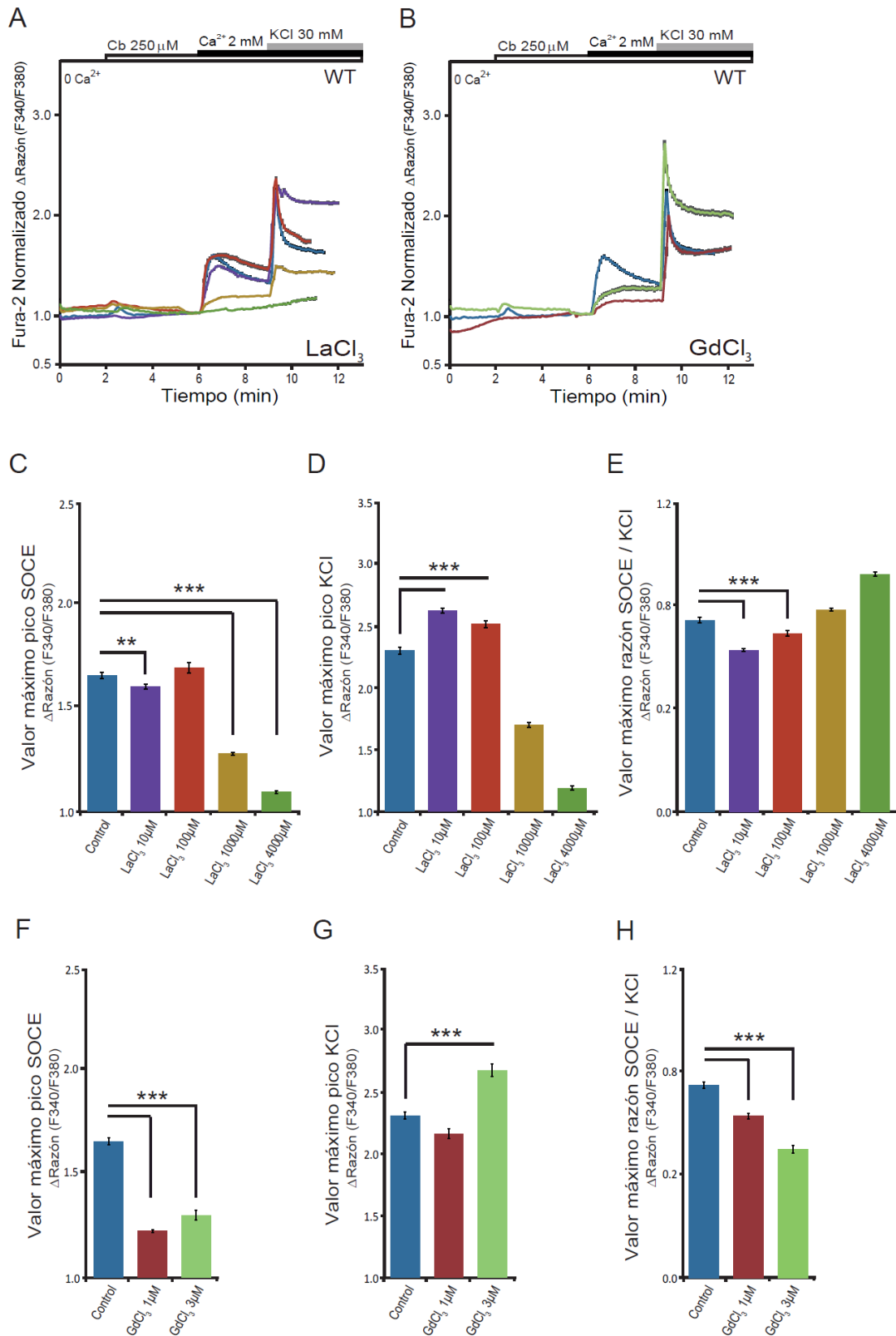
mecanismo SOCE se determinó como en experimentos anteriores, añadiendo en este caso al inicio del experimento el inhibidor correspondiente a la concentración indicada. La magnitud de la respuesta SOCE se comparó con la respuesta a la estimulación con KCl 30 mM. **(A-B)** Comparación del efecto de diferentes dosis de los inhibidores LaCl_3 **(A)** y GdCl_3 **(B)**. **(C-E)** Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de 2-APB testadas sobre la actividad SOCE **(C)**, la respuesta a KCl **(D)** y la relación razón SOCE/KCl **(E)**, medido como valor máximo. **(F-H)** Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de YM-58483 testadas sobre la actividad SOCE **(F)**, la respuesta a KCl **(G)** y la relación razón SOCE/KCl **(H)**, medido como valor máximo. Se analizaron más de 60 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, test de Student.

La razón SOCE/KCl disminuye también: en las neuronas WT un 15.76% y un 6.90% para las concentraciones de 10 y 100 μM , respectivamente (Fig. S2E), y en las neuronas *Gdap1*-KO un 1.25% y un 3.59% para las concentraciones de 10 y 100 μM , respectivamente (Fig. S3E). A concentraciones elevadas del La^{3+} , 1000 y 4000 μM , el efecto inhibitorio sobre el SOCE es muy significativo en ambos genotipos, pero la acción del compuesto deja de ser específica sobre el canal SOCE e inhibe también casi completamente la acción de los receptores VGCCs (Fig. S2C-E y Fig. S3C-E).

En último lugar, testamos el efecto del Gd^{3+} utilizando bajas concentraciones de este ion trivalente (Fig. S2B y Fig. S3B). El efecto inhibitorio sobre el SOCE es muy significativo tanto a la concentración de 1 μM como a la de 3 μM : la inhibición del SOCE es del 26.22% y del 17.32% en neuronas WT (Fig. S2F) y en neuronas *Gdap1*-KO (Fig. S3F), respectivamente, para la concentración de 1 μM , y del 21.58% en neuronas WT para la concentración de 3 μM (Fig. S2F). Sin embargo, la estimulación de la acción de los VGCCs sólo es más clara a la concentración de 3 μM : se produce un aumento en la entrada de Ca^{2+} por alto K^+ del 15.82% (Fig. S2G) y una disminución de la razón SOCE/KCl del 33.38% (Fig. S2H) en las neuronas WT.

(página siguiente) **FIGURA S3. Inhibición farmacológica del mecanismo SOCE en neuronas cerebelares *Gdap1*-KO.** Determinación de las señales de $\text{Ca}^{2+}_{\text{cit}}$ en el soma de neuronas cerebelares *Gdap1*-KO. La actividad del mecanismo SOCE se determinó como en experimentos anteriores, añadiendo en este caso al inicio del experimento el inhibidor correspondiente a la concentración indicada. La magnitud de la respuesta SOCE se comparó con la respuesta a la estimulación con KCl 30 mM. **(A-B)** Comparación del efecto de diferentes dosis de los inhibidores LaCl_3 **(A)** y GdCl_3 **(B)**. **(C-E)** Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de 2-APB testadas sobre la actividad SOCE **(C)**, la respuesta a KCl **(D)** y la relación razón SOCE/KCl **(E)**, medido como valor máximo. **(F-H)** Cuantificación del efecto de las diferentes concentraciones de YM-58483 testadas sobre la actividad SOCE **(F)**, la respuesta a KCl **(G)** y la relación razón SOCE/KCl **(H)**, medido como valor

máximo. Se analizaron más de 100 células de al menos 3 experimentos independientes. Los datos están expresados como media \pm SEM. *** $p < 0.001$, test de Student.



BIBLIOGRAFÍA

- AKL, H. & BULTYNCK, G. 2013. Altered Ca(2+) signaling in cancer cells: proto-oncogenes and tumor suppressors targeting IP3 receptors. *Biochim Biophys Acta*, 1835, 180-93.
- ALAVIAN, K. N., BEUTNER, G., LAZROVE, E., SACCHETTI, S., PARK, H. A., LICZNERSKI, P., LI, H., NABILI, P., HOCKENSMITH, K., GRAHAM, M., PORTER, G. A., JR. & JONAS, E. A. 2014. An uncoupling channel within the c-subunit ring of the F1FO ATP synthase is the mitochondrial permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111, 10580-5.
- ALBARRAN, L., DIONISIO, N., LOPEZ, E., SALIDO, G. M., REDONDO, P. C. & ROSADO, J. A. 2014. STIM1 regulates TRPC6 heteromultimerization and subcellular location. *Biochem J*, 463, 373-81.
- ALONSO, M. T., MANJARRES, I. M. & GARCIA-SANCHO, J. 2012. Privileged coupling between Ca(2+) entry through plasma membrane store-operated Ca(2+) channels and the endoplasmic reticulum Ca(2+) pump. *Mol Cell Endocrinol*, 353, 37-44.
- ALVARINO, R., ALONSO, E., TRIBALAT, M. A., GEGUNDE, S., THOMAS, O. P. & BOTANA, L. M. 2017. Evaluation of the Protective Effects of Sarains on H2O2-Induced Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Neurotox Res*.
- AMIGO, I., TRABA, J., GONZALEZ-BARROSO, M. M., RUEDA, C. B., FERNANDEZ, M., RIAL, E., SANCHEZ, A., SATRUSTEGUI, J. & DEL ARCO, A. 2013. Glucagon regulation of oxidative phosphorylation requires an increase in matrix adenine nucleotide content through Ca2+ activation of the mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SCA_{MC}-3. *J Biol Chem*, 288, 7791-802.
- ANGELIN, A., TIEPOLO, T., SABATELLI, P., GRUMATI, P., BERGAMIN, N., GOLFERI, C., MATTIOLI, E., GUALANDI, F., FERLINI, A., MERLINI, L., MARALDI, N. M., BONALDO, P. & BERNARDI, P. 2007. Mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of Ullrich congenital muscular dystrophy and prospective therapy with cyclosporins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 991-6.
- APRILLE, J. R. 1993. Mechanism and regulation of the mitochondrial ATP-Mg/P(i) carrier. *J Bioenerg Biomembr*, 25, 473-81.
- ASHRAF, S., GEE, H. Y., WOERNER, S., XIE, L. X., VEGA-WARNER, V., LOVRIC, S., FANG, H., SONG, X., CATTRAN, D. C., AVILA-CASADO, C., PATERSON, A. D., NITSCHKE, P., BOLE-FEYSOT, C., COCHAT, P., ESTEVE-RUDD, J., HABERBERGER, B., ALLEN, S. J., ZHOU, W., AIRIK, R., OTTO, E. A., BARUA, M., AL-HAMED, M. H., KARI, J. A., EVANS, J., BIERZYNSKA, A., SALEEM, M. A., BOCKENHAUER, D., KLETA, R., EL DESOKY, S., HACIHAMDIOGLU, D. O., GOK, F., WASHBURN, J., WIGGINS, R. C., CHOI, M., LIFTON, R. P., LEVY, S., HAN, Z., SALVIATI, L., PROKISCH, H., WILLIAMS, D. S., POLLAK, M., CLARKE, C. F., PEI, Y., ANTIGNAC, C. & HILDEBRANDT, F. 2013. ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest*, 123, 5179-89.
- BABA, A., YASUI, T., FUJISAWA, S., YAMADA, R. X., YAMADA, M. K., NISHIYAMA, N., MATSUKI, N. & IKEGAYA, Y. 2003. Activity-evoked capacitative Ca2+ entry: implications in synaptic plasticity. *J Neurosci*, 23, 7737-41.
- BACKONJA, M., WALLACE, M. S., BLONSKY, E. R., CUTLER, B. J., MALAN, P., JR., RAUCK, R., TOBIAS, J. & GROUP, N.-C. S. 2008. NGX-4010, a high-concentration capsaicin patch, for the treatment of postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind study. *Lancet Neurol*, 7, 1106-12.
- BALABAN, R. S. 2009. The role of Ca(2+) signaling in the coordination of mitochondrial ATP production with cardiac work. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1334-41.

- BARNEO-MUNOZ, M., JUAREZ, P., CIVERA-TREGON, A., YNDRIAGO, L., PLA-MARTIN, D., ZENKER, J., CUEVAS-MARTIN, C., ESTELA, A., SANCHEZ-ARAGO, M., FORTEZA-VILA, J., CUEZVA, J. M., CHRAST, R. & PALAU, F. 2015. Lack of GDAP1 induces neuronal calcium and mitochondrial defects in a knockout mouse model of charcot-marie-tooth neuropathy. *PLoS Genet*, 11, e1005115.
- BARRETO, L. C., OLIVEIRA, F. S., NUNES, P. S., DE FRANCA COSTA, I. M., GARCEZ, C. A., GOES, G. M., NEVES, E. L., DE SOUZA SIQUEIRA QUINTANS, J. & DE SOUZA ARAUJO, A. A. 2016. Epidemiologic Study of Charcot-Marie-Tooth Disease: A Systematic Review. *Neuroepidemiology*, 46, 157-65.
- BAUGHMAN, J. M., PEROCCHI, F., GIRGIS, H. S., PLOVANICH, M., BELCHER-TIMME, C. A., SANCAK, Y., BAO, X. R., STRITTMATTER, L., GOLDBERGER, O., BOGORAD, R. L., KOTELIANSKY, V. & MOOTHA, V. K. 2011. Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 341-5.
- BAXTER, R. V., BEN OTHMANE, K., ROCHELLE, J. M., STAJICH, J. E., HULETTE, C., DEW-KNIGHT, S., HENTATI, F., BEN HAMIDA, M., BEL, S., STENGER, J. E., GILBERT, J. R., PERICAK-VANCE, M. A. & VANCE, J. M. 2002. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet*, 30, 21-2.
- BEHBAHANI, H., SHABALINA, I. G., WIEHAGER, B., CONCHA, H., HULTENBY, K., PETROVIC, N., NEDERGAARD, J., WINBLAD, B., COWBURN, R. F. & ANKARCROMA, M. 2006. Differential role of Presenilin-1 and -2 on mitochondrial membrane potential and oxygen consumption in mouse embryonic fibroblasts. *J Neurosci Res*, 84, 891-902.
- BERNA-ERRO, A., BRAUN, A., KRAFT, R., KLEINSCHNITZ, C., SCHUHMANN, M. K., STEGNER, D., WULTSCH, T., EILERS, J., MEUTH, S. G., STOLL, G. & NIESWANDT, B. 2009. STIM2 regulates capacitive Ca²⁺ entry in neurons and plays a key role in hypoxic neuronal cell death. *Sci Signal*, 2, ra67.
- BERNA-ERRO, A., REDONDO, P. C. & ROSADO, J. A. 2012. Store-operated Ca(2+) entry. *Adv Exp Med Biol*, 740, 349-82.
- BERNARDI, P. & BONALDO, P. 2008. Dysfunction of mitochondria and sarcoplasmic reticulum in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies. *Ann N Y Acad Sci*, 1147, 303-11.
- BERNARDI, P. & BONALDO, P. 2013. Mitochondrial dysfunction and defective autophagy in the pathogenesis of collagen VI muscular dystrophies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5, a011387.
- BERNARDI, P. 2013. The mitochondrial permeability transition pore: a mystery solved? *Front Physiol*, 4, 95.
- BERNARDI, P., KRAUSKOPF, A., BASSO, E., PETRONILLI, V., BLACHLY-DYSON, E., DI LISA, F. & FORTE, M. A. 2006. The mitochondrial permeability transition from in vitro artifact to disease target. *FEBS J*, 273, 2077-99.
- BLUMKIN, L., LESHINSKY-SILVER, E., ZEREM, A., YOSOVICH, K., LERMAN-SAGIE, T. & LEV, D. 2014. Heterozygous Mutations in the ADCK3 Gene in Siblings with Cerebellar Atrophy and Extreme Phenotypic Variability. *JIMD Rep*, 12, 103-7.

- BOLLIMUNTHA, S., SINGH, B. B., SHAVALI, S., SHARMA, S. K. & EBADI, M. 2005. TRPC1-mediated inhibition of 1-methyl-4-phenylpyridinium ion neurotoxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *J Biol Chem*, 280, 2132-40.
- BONIN, R. P., BORIES, C. & DE KONINCK, Y. 2014. A simplified up-down method (SUDO) for measuring mechanical nociception in rodents using von Frey filaments. *Mol Pain*, 10, 26.
- BONORA, M. & PINTON, P. 2014. The mitochondrial permeability transition pore and cancer: molecular mechanisms involved in cell death. *Front Oncol*, 4, 302.
- BONORA, M., BONONI, A., DE MARCHI, E., GIORGI, C., LEBIEDZINSKA, M., MARCHI, S., PATERGNANI, S., RIMESSI, A., SUSKI, J. M., WOJTALA, A., WIECKOWSKI, M. R., KROEMER, G., GALLUZZI, L. & PINTON, P. 2013a. Role of the c subunit of the FO ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Cell Cycle*, 12, 674-83.
- BONORA, M., GIORGI, C., BONONI, A., MARCHI, S., PATERGNANI, S., RIMESSI, A., RIZZUTO, R. & PINTON, P. 2013b. Subcellular calcium measurements in mammalian cells using jellyfish photoprotein aequorin-based probes. *Nat Protoc*, 8, 2105-18.
- BONORA, M., MORGANTI, C., MORCIANO, G., GIORGI, C., WIECKOWSKI, M. R. & PINTON, P. 2016. Comprehensive analysis of mitochondrial permeability transition pore activity in living cells using fluorescence-imaging-based techniques. *Nat Protoc*, 11, 1067-80.
- BOURINET, E., ALTIER, C., HILDEBRAND, M. E., TRANG, T., SALTER, M. W. & ZAMPONI, G. W. 2014. Calcium-permeable ion channels in pain signaling. *Physiol Rev*, 94, 81-140.
- BRANDMAN, O., LIOU, J., PARK, W. S. & MEYER, T. 2007. STIM2 is a feedback regulator that stabilizes basal cytosolic and endoplasmic reticulum Ca²⁺ levels. *Cell*, 131, 1327-39.
- BRITO, R., SHETH, S., MUKHERJEA, D., RYBAK, L. P. & RAMKUMAR, V. 2014. TRPV1: A Potential Drug Target for Treating Various Diseases. *Cells*, 3, 517-45.
- CABRERA, J. R., VIEJO-BORBOLLA, A., MARTINEZ-MARTIN, N., BLANCO, S., WANDOSELL, F. & ALCAMI, A. 2015. Secreted herpes simplex virus-2 glycoprotein G modifies NGF-TrkA signaling to attract free nerve endings to the site of infection. *PLoS Pathog*, 11, e1004571.
- CAMELLO-ALMARAZ, C., GOMEZ-PINILLA, P. J., POZO, M. J. & CAMELLO, P. J. 2006. Mitochondrial reactive oxygen species and Ca²⁺ signaling. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C1082-8.
- CARAFOLI, E. 1987. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem*, 56, 395-433.
- CARRARO, M. & BERNARDI, P. 2016. Calcium and reactive oxygen species in regulation of the mitochondrial permeability transition and of programmed cell death in yeast. *Cell Calcium*, 60, 102-7.
- CARRARO, M., GIORGIO, V., SILEIKYTE, J., SARTORI, G., FORTE, M., LIPPE, G., ZORATTI, M., SZABO, I. & BERNARDI, P. 2014. Channel formation by yeast F-ATP synthase and the role of dimerization in the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, 289, 15980-5.
- CASSEREAU, J., CHEVROLIER, A., BONNEAU, D., VERNY, C., PROCACCIO, V., REYNIER, P. & FERRE, M. 2011a. A locus-specific database for mutations in GDAP1 allows analysis of genotype-phenotype correlations in Charcot-Marie-Tooth diseases type 4A and 2K. *Orphanet J Rare Dis*, 6, 87.

- CASSEREAU, J., CHEVROLLIER, A., GUEGUEN, N., DESQUIRET, V., VERNY, C., NICOLAS, G., DUBAS, F., AMATI-BONNEAU, P., REYNIER, P., BONNEAU, D. & PROCACCIO, V. 2011b. Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Exp Neurol*, 227, 31-41.
- CASSEREAU, J., CHEVROLLIER, A., GUEGUEN, N., MALINGE, M. C., LETOURNEL, F., NICOLAS, G., RICHARD, L., FERRE, M., VERNY, C., DUBAS, F., PROCACCIO, V., AMATI-BONNEAU, P., BONNEAU, D. & REYNIER, P. 2009. Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics*, 10, 145-50.
- CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D. & JULIUS, D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-24.
- CHAPLAN, S. R., BACH, F. W., POGREL, J. W., CHUNG, J. M. & YAKSH, T. L. 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods*, 53, 55-63.
- CHARCOT, J. M. & MARIE, P. 1886. Sur une form particulie're d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, debutant par les pieds et les jambes, et atteignant plus tard les mains. *Rev Med*, 97-138.
- CHARD, P. S., BLEAKMAN, D., SAVIDGE, J. R. & MILLER, R. J. 1995. Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. *Neuroscience*, 65, 1099-108.
- CHEN, X., WU, J., LVOVSKAYA, S., HERNDON, E., SUPNET, C. & BEZPROZVANNY, I. 2011. Dantrolene is neuroprotective in Huntington's disease transgenic mouse model. *Mol Neurodegener*, 6, 81.
- CHEN, Y., SMITH, M. L., CHIOU, G. X., BALLARON, S., SHEETS, M. P., GUBBINS, E., WARRIOR, U., WILKINS, J., SUROWY, C., NAKANE, M., CARTER, G. W., TREVILLYAN, J. M., MOLLISON, K. & DJURIC, S. W. 2002. TH1 and TH2 cytokine inhibition by 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazoles, a novel class of immunomodulators. *Cell Immunol*, 220, 134-42.
- CHENG, K. T., ONG, H. L., LIU, X. & AMBUDKAR, I. S. 2013. Contribution and regulation of TRPC channels in store-operated Ca²⁺ entry. *Curr Top Membr*, 71, 149-79.
- CHOI, Y. W., PARK, T. J., KIM, H. S. & LIM, I. K. 2013. Signals regulating necrosis of cardiomyoblast by BTG2(/TIS21/PC3) via activation of GSK3beta and opening of mitochondrial permeability transition pore in response to H₂O₂. *Biochem Biophys Res Commun*, 434, 559-65.
- CLARAMUNT, R., PEDROLA, L., SEVILLA, T., LOPEZ DE MUNAIN, A., BERCIANO, J., CUESTA, A., SANCHEZ-NAVARRO, B., MILLAN, J. M., SAIFI, G. M., LUPSKI, J. R., VILCHEZ, J. J., ESPINOS, C. & PALAU, F. 2005. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet*, 42, 358-65.
- CONTENTO, R. L., CAMPELLO, S., TROVATO, A. E., MAGRINI, E., ANSELMINI, F. & VIOLA, A. 2010. Adhesion shapes T cells for prompt and sustained T-cell receptor signalling. *EMBO J*, 29, 4035-47.
- CONTRERAS, L., DRAGO, I., ZAMPESE, E. & POZZAN, T. 2010. Mitochondria: the calcium connection. *Biochim Biophys Acta*, 1797, 607-18.
- COTAN, D., CORDERO, M. D., GARRIDO-MARAVER, J., OROPESA-AVILA, M., RODRIGUEZ-HERNANDEZ, A., GOMEZ IZQUIERDO, L., DE LA MATA, M., DE MIGUEL, M., LORITE, J. B., INFANTE, E. R.,

- JACKSON, S., NAVAS, P. & SANCHEZ-ALCAZAR, J. A. 2011. Secondary coenzyme Q10 deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy in MELAS fibroblasts. *FASEB J*, 25, 2669-87.
- CSORDAS, G., VARNAI, P., GOLENAR, T., ROY, S., PURKINS, G., SCHNEIDER, T. G., BALLA, T. & HAJNOCZKY, G. 2010. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol Cell*, 39, 121-32.
- CUESTA, A., PEDROLA, L., SEVILLA, T., GARCIA-PLANELL, J., CHUMILLAS, M. J., MAYORDOMO, F., LEGUERN, E., MARIN, I., VILCHEZ, J. J. & PALAU, F. 2002. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet*, 30, 22-5.
- CZEREDYS, M., GRUSZCZYNSKA-BIEGALA, J., SCHACHT, T., METHNER, A. & KUZNICKI, J. 2013. Expression of genes encoding the calcium signalosome in cellular and transgenic models of Huntington's disease. *Front Mol Neurosci*, 6, 42.
- DAVIDSON, S. M., YELLON, D. & DUCHEN, M. R. 2007. Assessing mitochondrial potential, calcium, and redox state in isolated mammalian cells using confocal microscopy. *Methods Mol Biol*, 372, 421-30.
- DAVIS, C. J., BRADLEY, W. G. & MADRID, R. 1978. The peroneal muscular atrophy syndrome: clinical, genetic, electrophysiological and nerve biopsy studies. I. Clinical, genetic and electrophysiological findings and classification. *J Genet Hum*, 26, 311-49.
- DE JUAN-SANZ, J., HOLT, G. T., SCHREITER, E. R., DE JUAN, F., KIM, D. S. & RYAN, T. A. 2017. Axonal Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Content Controls Release Probability in CNS Nerve Terminals. *Neuron*, 93, 867-881 e6.
- DE STEFANI, D., RAFFAELLO, A., TEARDO, E., SZABO, I. & RIZZUTO, R. 2011. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature*, 476, 336-40.
- DEL ARCO, A. & SATRUSTEGUI, J. 2004. Identification of a novel human subfamily of mitochondrial carriers with calcium-binding domains. *J Biol Chem*, 279, 24701-13.
- DELUCA, H. F. & ENGSTROM, G. W. 1961. Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 47, 1744-50.
- DEMAUREX, N., POBURKO, D. & FRIEDEN, M. 2009. Regulation of plasma membrane calcium fluxes by mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1787, 1383-94.
- DETMER, S. A. & CHAN, D. C. 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 870-9.
- DI LISA, F. & BERNARDI, P. 2009. A CaPful of mechanisms regulating the mitochondrial permeability transition. *J Mol Cell Cardiol*, 46, 775-80.
- DIONISIO, N., REDONDO, P. C., JARDIN, I. & ROSADO, J. A. 2012. Transient receptor potential channels in human platelets: expression and functional role. *Curr Mol Med*, 12, 1319-28.
- DOLMETSCH, R. E., PAJVANI, U., FIFE, K., SPOTTS, J. M. & GREENBERG, M. E. 2001. Signaling to the nucleus by an L-type calcium channel-calmodulin complex through the MAP kinase pathway. *Science*, 294, 333-9.

- DOONAN, P. J., CHANDRAMOORTHY, H. C., HOFFMAN, N. E., ZHANG, X., CARDENAS, C., SHANMUGHAPRIYA, S., RAJAN, S., VALLEM, S., CHEN, X., FOSKETT, J. K., CHEUNG, J. Y., HOUSER, S. R. & MADESH, M. 2014. LETM1-dependent mitochondrial Ca^{2+} flux modulates cellular bioenergetics and proliferation. *FASEB J*, 28, 4936-49.
- DU, Y., WOOTEN, M. C., GEARING, M. & WOOTEN, M. W. 2009. Age-associated oxidative damage to the p62 promoter: implications for Alzheimer disease. *Free Radic Biol Med*, 46, 492-501.
- DUBIN, A. E. & PATAPOUTIAN, A. 2010. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. *J Clin Invest*, 120, 3760-72.
- DUCHEN, M. R. 1992. Ca^{2+} -dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J*, 283 (Pt 1), 41-50.
- DUCHEN, M. R. 2000a. Mitochondria and Ca^{2+} in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium*, 28, 339-48.
- DUCHEN, M. R. 2000b. Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. *J Physiol*, 529 Pt 1, 57-68.
- DUNHAM, N. W. & MIYA, T. S. 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*, 46, 208-9.
- DYCK, P. J. & LAMBERT, E. H. 1968. Lower motor and primary sensory neuron diseases with peroneal muscular atrophy. I. Neurologic, genetic, and electrophysiologic findings in hereditary polyneuropathies. *Arch Neurol*, 18, 603-18.
- EMPTAGE, N. J., REID, C. A. & FINE, A. 2001. Calcium stores in hippocampal synaptic boutons mediate short-term plasticity, store-operated Ca^{2+} entry, and spontaneous transmitter release. *Neuron*, 29, 197-208.
- ERICSON, U. & BORG, K. 1999. Analysis of sensory function in Charcot-Marie-Tooth disease. *Acta Neurol Scand*, 99, 291-6.
- ESTELA, A., PLA-MARTIN, D., SANCHEZ-PIRIS, M., SESAKI, H. & PALAU, F. 2011. Charcot-Marie-Tooth-related gene GDAP1 complements cell cycle delay at G2/M phase in *Saccharomyces cerevisiae* fis1 gene-defective cells. *J Biol Chem*, 286, 36777-86.
- FESKE, S., GWACK, Y., PRAKRIYA, M., SRIKANTH, S., PUPPEL, S. H., TANASA, B., HOGAN, P. G., LEWIS, R. S., DALY, M. & RAO, A. 2006. A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature*, 441, 179-85.
- FIERMONTE, G., DE LEONARDIS, F., TODISCO, S., PALMIERI, L., LASORSA, F. M. & PALMIERI, F. 2004. Identification of the mitochondrial ATP-Mg/Pi transporter. Bacterial expression, reconstitution, functional characterization, and tissue distribution. *J Biol Chem*, 279, 30722-30.
- FONTAINE, E., ICHAS, F. & BERNARDI, P. 1998. A ubiquinone-binding site regulates the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 273, 25734-40.
- FONTERIZ, R., MATESANZ-ISABEL, J., ARIAS-DEL-VAL, J., ALVAREZ-ILLERA, P., MONTERO, M. & ALVAREZ, J. 2016. Modulation of Calcium Entry by Mitochondria. *Adv Exp Med Biol*, 898, 405-21.

- FRIEDEN, M., JAMES, D., CASTELBOU, C., DANCKAERT, A., MARTINOU, J. C. & DEMAUREX, N. 2004. Ca(2+) homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1. *J Biol Chem*, 279, 22704-14.
- GAO, R., GAO, X., XIA, J., TIAN, Y., BARRETT, J. E., DAI, Y. & HU, H. 2013. Potent analgesic effects of a store-operated calcium channel inhibitor. *Pain*, 154, 2034-44.
- GAO, X. H., GAO, R., TIAN, Y. Z., MCGONIGLE, P., BARRETT, J. E., DAI, Y. & HU, H. 2015. A store-operated calcium channel inhibitor attenuates collagen-induced arthritis. *Br J Pharmacol*, 172, 2991-3002.
- GARAMI, A., PAKAI, E., OLIVEIRA, D. L., STEINER, A. A., WANNER, S. P., ALMEIDA, M. C., LESNIKOV, V. A., GAVVA, N. R. & ROMANOVSKY, A. A. 2011. Thermoregulatory phenotype of the Trpv1 knockout mouse: thermoeffector dysbalance with hyperkinesia. *J Neurosci*, 31, 1721-33.
- GARCIA-SANCHO, J. 2014. The coupling of plasma membrane calcium entry to calcium uptake by endoplasmic reticulum and mitochondria. *J Physiol*, 592, 261-8.
- GASSMANN, K., SCHREIBER, T., DINGEMANS, M. M., KRAUSE, G., RODERIGO, C., GIERSEFER, S., SCHUWALD, J., MOORS, M., UNFRIED, K., BERGMAN, A., WESTERINK, R. H., ROSE, C. R. & FRITSCH, E. 2014. BDE-47 and 6-OH-BDE-47 modulate calcium homeostasis in primary fetal human neural progenitor cells via ryanodine receptor-independent mechanisms. *Arch Toxicol*, 88, 1537-48.
- GEMES, G., BANGARU, M. L., WU, H. E., TANG, Q., WEIHRAUCH, D., KOOPMEINERS, A. S., CRUIKSHANK, J. M., KWOK, W. M. & HOGAN, Q. H. 2011. Store-operated Ca²⁺ entry in sensory neurons: functional role and the effect of painful nerve injury. *J Neurosci*, 31, 3536-49.
- GHOSH, A. & GREENBERG, M. E. 1995. Calcium signaling in neurons: molecular mechanisms and cellular consequences. *Science*, 268, 239-47.
- GIACOMELLO, M., DRAGO, I., BORTOLOZZI, M., SCORZETO, M., GIANELLE, A., PIZZO, P. & POZZAN, T. 2010. Ca²⁺ hot spots on the mitochondrial surface are generated by Ca²⁺ mobilization from stores, but not by activation of store-operated Ca²⁺ channels. *Mol Cell*, 38, 280-90.
- GIAIME, E., YAMAGUCHI, H., GAUTIER, C. A., KITADA, T. & SHEN, J. 2012. Loss of DJ-1 does not affect mitochondrial respiration but increases ROS production and mitochondrial permeability transition pore opening. *PLoS One*, 7, e40501.
- GILABERT, J. A. & PAREKH, A. B. 2000. Respiring mitochondria determine the pattern of activation and inactivation of the store-operated Ca(2+) current I(CRAC). *EMBO J*, 19, 6401-7.
- GIORGI, C., ROMAGNOLI, A., PINTON, P. & RIZZUTO, R. 2008. Ca²⁺ signaling, mitochondria and cell death. *Curr Mol Med*, 8, 119-30.
- GIORGIO, V., VON STOCKUM, S., ANTONIEL, M., FABBRO, A., FOGOLARI, F., FORTE, M., GLICK, G. D., PETRONILLI, V., ZORATTI, M., SZABO, I., LIPPE, G. & BERNARDI, P. 2013. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 5887-92.
- GLITSCH, M. D., BAKOWSKI, D. & PAREKH, A. B. 2002. Store-operated Ca²⁺ entry depends on mitochondrial Ca²⁺ uptake. *EMBO J*, 21, 6744-54.

- GONZALEZ-SANCHEZ, P. 2017. *Store-operated calcium entry in neural cells. A role in Charcot-Marie-Tooth disease*. Universidad Autónoma de Madrid.
- GONZALEZ-SANCHEZ, P., PLA-MARTIN, D., MARTINEZ-VALERO, P., RUEDA, C. B., CALPENA, E., DEL ARCO, A., PALAU, F. & SATRUSTEGUI, J. 2017. CMT-linked loss-of-function mutations in GDAP1 impair store-operated Ca²⁺ entry-stimulated respiration. *Sci Rep*, 7, 42993.
- GUNTER, T. E., YULE, D. I., GUNTER, K. K., ELISEEV, R. A. & SALTER, J. D. 2004. Calcium and mitochondria. *FEBS Lett*, 567, 96-102.
- HAO, B., LU, Y., WANG, Q., GUO, W., CHEUNG, K. H. & YUE, J. 2014. Role of STIM1 in survival and neural differentiation of mouse embryonic stem cells independent of Orai1-mediated Ca²⁺ entry. *Stem Cell Res*, 12, 452-66.
- HARDING, A. E. & THOMAS, P. K. 1980. The clinical features of hereditary motor and sensory neuropathy types I and II. *Brain*, 103, 259-80.
- HARGREAVES, K., DUBNER, R., BROWN, F., FLORES, C. & JORIS, J. 1988. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia. *Pain*, 32, 77-88.
- HARRAZ, O. F. & ALTIER, C. 2014. STIM1-mediated bidirectional regulation of Ca(2+) entry through voltage-gated calcium channels (VGCC) and calcium-release activated channels (CRAC). *Front Cell Neurosci*, 8, 43.
- HARRIS, E. J. 1977. The uptake and release of calcium by heart mitochondria. *Biochem J*, 168, 447-56.
- HARTMANN, J., KARL, R. M., ALEXANDER, R. P., ADELSBERGER, H., BRILL, M. S., RUHLMANN, C., ANSEL, A., SAKIMURA, K., BABA, Y., KUROSAKI, T., MISGELD, T. & KONNERTH, A. 2014. STIM1 controls neuronal Ca(2)(+) signaling, mGluR1-dependent synaptic transmission, and cerebellar motor behavior. *Neuron*, 82, 635-44.
- HAWORTH, R. A. & HUNTER, D. R. 1980. Allosteric inhibition of the Ca²⁺-activated hydrophilic channel of the mitochondrial inner membrane by nucleotides. *J Membr Biol*, 54, 231-6.
- HE, L. P., HEWAVITHARANA, T., SOBOLOFF, J., SPASSOVA, M. A. & GILL, D. L. 2005. A functional link between store-operated and TRPC channels revealed by the 3,5-bis(trifluoromethyl)pyrazole derivative, BTP2. *J Biol Chem*, 280, 10997-1006.
- HEILMEYER, L. M., JR. 1991. Molecular basis of signal integration in phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta*, 1094, 168-74.
- HEINE, M., CIURASZKIEWICZ, A., VOIGT, A., HECK, J. & BIKBAEV, A. 2016. Surface dynamics of voltage-gated ion channels. *Channels (Austin)*, 10, 267-81.
- HERNANDEZ-GUIJO, J. M., MANEU-FLORES, V. E., RUIZ-NUNO, A., VILLARROYA, M., GARCIA, A. G. & GANDIA, L. 2001. Calcium-dependent inhibition of L, N, and P/Q Ca²⁺ channels in chromaffin cells: role of mitochondria. *J Neurosci*, 21, 2553-60.
- HEUSCH, G. 2015. Treatment of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury by Ischemic and Pharmacological Postconditioning. *Compr Physiol*, 5, 1123-45.
- HOOVER, R., ROTHBERG, B. S. & SOBOLOFF, J. 2014. Neuronal STIMulation at rest. *Sci Signal*, 7, pe18.
- HOTH, M. & PENNER, R. 1992. Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature*, 355, 353-6.

- HOTH, M., FANGER, C. M. & LEWIS, R. S. 1997. Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol*, 137, 633-48.
- HUNTER, D. R. & HAWORTH, R. A. 1979. The Ca^{2+} -induced membrane transition in mitochondria. I. The protective mechanisms. *Arch Biochem Biophys*, 195, 453-9.
- IIDA, T., SHIMIZU, I., NEALEN, M. L., CAMPBELL, A. & CATERINA, M. 2005. Attenuated fever response in mice lacking TRPV1. *Neurosci Lett*, 378, 28-33.
- IRWIN, W. A., BERGAMIN, N., SABATELLI, P., REGGIANI, C., MEGIGHIAN, A., MERLINI, L., BRAGHETTA, P., COLUMBARO, M., VOLPIN, D., BRESSAN, G. M., BERNARDI, P. & BONALDO, P. 2003. Mitochondrial dysfunction and apoptosis in myopathic mice with collagen VI deficiency. *Nat Genet*, 35, 367-71.
- ISHIKAWA, J., OHGA, K., YOSHINO, T., TAKEZAWA, R., ICHIKAWA, A., KUBOTA, H. & YAMADA, T. 2003. A pyrazole derivative, YM-58483, potently inhibits store-operated sustained Ca^{2+} influx and IL-2 production in T lymphocytes. *J Immunol*, 170, 4441-9.
- IUSO, A., SCACCO, S., PICCOLI, C., BELLOMO, F., PETRUZZELLA, V., TRENTADUE, R., MINUTO, M., RIPOLI, M., CAPITANIO, N., ZEVIANI, M. & PAPA, S. 2006. Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I. *J Biol Chem*, 281, 10374-80.
- JANCSO, G., KIRALY, E. & JANCSO-GABOR, A. 1977. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*, 270, 741-3.
- JIANG, D., ZHAO, L. & CLAPHAM, D. E. 2009. Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter. *Science*, 326, 144-7.
- JIANG, D., ZHAO, L., CLISH, C. B. & CLAPHAM, D. E. 2013. Letm1, the mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter, is essential for normal glucose metabolism and alters brain function in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, E2249-54.
- JIANG, M. & CHEN, G. 2006. High Ca^{2+} -phosphate transfection efficiency in low-density neuronal cultures. *Nat Protoc*, 1, 695-700.
- JONES, B. J. & ROBERTS, D. J. 1968. The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol*, 20, 302-4.
- JONES, V. M., MOORE, K. A. & PETERSON, D. M. 2011. Capsaicin 8% topical patch (Qutenza)--a review of the evidence. *J Pain Palliat Care Pharmacother*, 25, 32-41.
- JOSEPH, N., REICHER, B. & BARDA-SAAD, M. 2014. The calcium feedback loop and T cell activation: how cytoskeleton networks control intracellular calcium flux. *Biochim Biophys Acta*, 1838, 557-68.
- JOYAL, J. L. & APRILLE, J. R. 1992. The ATP-Mg/Pi carrier of rat liver mitochondria catalyzes a divalent electroneutral exchange. *J Biol Chem*, 267, 19198-203.
- KANEKO, Y. & SZALLASI, A. 2014. Transient receptor potential (TRP) channels: a clinical perspective. *Br J Pharmacol*, 171, 2474-507.
- KANN, O. & KOVACS, R. 2007. Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol*, 292, C641-57.

- KARAI, L. J., RUSSELL, J. T., IADAROLA, M. J. & OLAH, Z. 2004. Vanilloid receptor 1 regulates multiple calcium compartments and contributes to Ca²⁺-induced Ca²⁺ release in sensory neurons. *J Biol Chem*, 279, 16377-87.
- KARAI, L., BROWN, D. C., MANNES, A. J., CONNELLY, S. T., BROWN, J., GANDAL, M., WELLISCH, O. M., NEUBERT, J. K., OLAH, Z. & IADAROLA, M. J. 2004. Deletion of vanilloid receptor 1-expressing primary afferent neurons for pain control. *J Clin Invest*, 113, 1344-52.
- KING, T., QU, C., OKUN, A., MERCADO, R., REN, J., BRION, T., LAI, J. & PORRECA, F. 2011. Contribution of afferent pathways to nerve injury-induced spontaneous pain and evoked hypersensitivity. *Pain*, 152, 1997-2005.
- KOPLAS, P. A., ROSENBERG, R. L. & OXFORD, G. S. 1997. The role of calcium in the desensitization of capsaicin responses in rat dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*, 17, 3525-37.
- KORZENIOWSKI, M. K., SZANDA, G., BALLA, T. & SPAT, A. 2009. Store-operated Ca²⁺ influx and subplasmalemmal mitochondria. *Cell Calcium*, 46, 49-55.
- KOUZOUKAS, D. E., LI, G., TAKAPOO, M., MONINGER, T., BHALLA, R. C. & PANTAZIS, N. J. 2013. Intracellular calcium plays a critical role in the alcohol-mediated death of cerebellar granule neurons. *J Neurochem*, 124, 323-35.
- KROEMER, G., GALLUZZI, L. & BRENNER, C. 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev*, 87, 99-163.
- LAGIER-TOURENNE, C., TAZIR, M., LOPEZ, L. C., QUINZII, C. M., ASSOUM, M., DROUOT, N., BUSO, C., MAKRI, S., ALI-PACHA, L., BENHASSINE, T., ANHEIM, M., LYNCH, D. R., THIBAULT, C., PLEWNIK, F., BIANCHETTI, L., TRANCHANT, C., POCH, O., DIMAURO, S., MANDEL, J. L., BARROS, M. H., HIRANO, M. & KOENIG, M. 2008. ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency. *Am J Hum Genet*, 82, 661-72.
- LAMARCHE, F., CARCENAC, C., GONTHIER, B., COTTET-ROUSSELLE, C., CHAUVIN, C., BARRET, L., LEVERVE, X., SAVASTA, M. & FONTAINE, E. 2013. Mitochondrial permeability transition pore inhibitors prevent ethanol-induced neuronal death in mice. *Chem Res Toxicol*, 26, 78-88.
- LAURA, M., HUTTON, E. J., BLAKE, J., LUNN, M. P., FOX, Z., PAREYSON, D., SOLARI, A., RADICE, D., KOLTZENBURG, M. & REILLY, M. M. 2014. Pain and small fiber function in Charcot-Marie-Tooth disease type 1A. *Muscle Nerve*, 50, 366-71.
- LEWIS, R. S. 2011. Store-operated calcium channels: new perspectives on mechanism and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- LIU, J., KIM, M. L., HEO, W. D., JONES, J. T., MYERS, J. W., FERRELL, J. E., JR. & MEYER, T. 2005. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion-triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol*, 15, 1235-41.
- LIU, H. & WU, C. 2017. Charcot Marie Tooth 2B Peripheral Sensory Neuropathy: How Rab7 Mutations Impact NGF Signaling? *Int J Mol Sci*, 18.
- LLORENTE-FOLCH, I., RUEDA, C. B., AMIGO, I., DEL ARCO, A., SAHEKI, T., PARDO, B. & SATRUSTEGUI, J. 2013. Calcium-regulation of mitochondrial respiration maintains ATP homeostasis and requires ARALAR/AGC1-malate aspartate shuttle in intact cortical neurons. *J Neurosci*, 33, 13957-71, 13971a.

- LOPEZ DEL AMO, V., SECO-CERVERA, M., GARCIA-GIMENEZ, J. L., WHITWORTH, A. J., PALLARDO, F. V. & GALINDO, M. I. 2015. Mitochondrial defects and neuromuscular degeneration caused by altered expression of *Drosophila* Gdap1: implications for the Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Hum Mol Genet*, 24, 21-36.
- LUND, P. & WIGGINS, D. 1986. The ornithine requirement of urea synthesis. Formation of ornithine from glutamine in hepatocytes. *Biochem J*, 239, 773-6.
- MALLILANKARAMAN, K., CARDENAS, C., DOONAN, P. J., CHANDRAMOORTHY, H. C., IRRINKI, K. M., GOLENAR, T., CSORDAS, G., MADIREDDI, P., YANG, J., MULLER, M., MILLER, R., KOLESAR, J. E., MOLGO, J., KAUFMAN, B., HAJNOCZKY, G., FOSKETT, J. K. & MADESH, M. 2012a. MCUR1 is an essential component of mitochondrial Ca^{2+} uptake that regulates cellular metabolism. *Nat Cell Biol*, 14, 1336-43.
- MALLILANKARAMAN, K., DOONAN, P., CARDENAS, C., CHANDRAMOORTHY, H. C., MULLER, M., MILLER, R., HOFFMAN, N. E., GANDHIRAJAN, R. K., MOLGO, J., BIRNBAUM, M. J., ROTHBERG, B. S., MAK, D. O., FOSKETT, J. K. & MADESH, M. 2012b. MICU1 is an essential gatekeeper for MCU-mediated mitochondrial Ca^{2+} uptake that regulates cell survival. *Cell*, 151, 630-44.
- MARTIKAINEN, M. H. & CHINNERY, P. F. 2015. Mitochondrial disease: mimics and chameleons. *Pract Neurol*, 15, 424-35.
- MARTIN-COFRECES, N. B., BAIXAULI, F. & SANCHEZ-MADRID, F. 2014. Immune synapse: conductor of orchestrated organelle movement. *Trends Cell Biol*, 24, 61-72.
- MARTINUCCI, S., SZABO, I., TOMBOLA, F. & ZORATTI, M. 2000. Ca^{2+} -reversible inhibition of the mitochondrial megachannel by ubiquinone analogues. *FEBS Lett*, 480, 89-94.
- MARTYN, C. N. & HUGHES, R. A. 1997. Epidemiology of peripheral neuropathy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 62, 310-8.
- MARUYAMA, T., KANAJI, T., NAKADE, S., KANNO, T. & MIKOSHIBA, K. 1997. 2APB, 2-aminoethoxydiphenyl borate, a membrane-penetrable modulator of $\text{Ins}(1,4,5)\text{P}_3$ -induced Ca^{2+} release. *J Biochem*, 122, 498-505.
- MCCORMACK, J. G., HALESTRAP, A. P. & DENTON, R. M. 1990. Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev*, 70, 391-425.
- MEDVEDEVA, Y. V., KIM, M. S. & USACHEV, Y. M. 2008. Mechanisms of prolonged presynaptic Ca^{2+} signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons. *J Neurosci*, 28, 5295-311.
- MEKAHLI, D., BULTYNCK, G., PARYS, J. B., DE SMEDT, H. & MISSIAEN, L. 2011. Endoplasmic-reticulum calcium depletion and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 3.
- MERLINI, L., ANGELIN, A., TIEPOLO, T., BRAGHETTA, P., SABATELLI, P., ZAMPARELLI, A., FERLINI, A., MARALDI, N. M., BONALDO, P. & BERNARDI, P. 2008. Cyclosporin A corrects mitochondrial dysfunction and muscle apoptosis in patients with collagen VI myopathies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5225-9.
- MERLINI, L., SABATELLI, P., ARMAROLI, A., GNUDI, S., ANGELIN, A., GRUMATI, P., MICHELINI, M. E., FRANCHELLA, A., GUALANDI, F., BERTINI, E., MARALDI, N. M., FERLINI, A., BONALDO, P. &

- BERNARDI, P. 2011. Cyclosporine A in Ullrich congenital muscular dystrophy: long-term results. *Oxid Med Cell Longev*, 2011, 139194.
- MILONE, M. & BENARROCH, E. E. 2012. Mitochondrial dynamics: general concepts and clinical implications. *Neurology*, 78, 1612-9.
- MITCHELL, P. & MOYLE, J. 1967. Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature*, 213, 137-9.
- MITCHELL, P. 2011. Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. 1966. *Biochim Biophys Acta*, 1807, 1507-38.
- MONTERO, M., BARRERO, M. J. & ALVAREZ, J. 1997. [Ca²⁺] microdomains control agonist-induced Ca²⁺ release in intact HeLa cells. *FASEB J*, 11, 881-5.
- MONTERO, M., GARCIA-SANCHO, J. & ALVAREZ, J. 1993. Transient inhibition by chemotactic peptide of a store-operated Ca²⁺ entry pathway in human neutrophils. *J Biol Chem*, 268, 13055-61.
- MORAN, M. M., MCALEXANDER, M. A., BIRO, T. & SZALLASI, A. 2011. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 601-20.
- MORAN, M., MARIN-BUERA, L., GIL-BORLADO, M. C., RIVERA, H., BLAZQUEZ, A., SENECA, S., VAZQUEZ-LOPEZ, M., ARENAS, J., MARTIN, M. A. & UGALDE, C. 2010. Cellular pathophysiological consequences of BCS1L mutations in mitochondrial complex III enzyme deficiency. *Hum Mutat*, 31, 930-41.
- MORONI, I., MORBIN, M., MILANI, M., CIANO, C., BUGIANI, M., PAGLIANO, E., CAVALLARO, T., PAREYSON, D. & TARONI, F. 2009. Novel mutations in the GDAP1 gene in patients affected with early-onset axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A. *Neuromuscul Disord*, 19, 476-80.
- MOSTACCIUOLO, M. L., MICAGLIO, G., FARDIN, P. & DANIELI, G. A. 1991. Genetic epidemiology of hereditary motor sensory neuropathies (type I). *Am J Med Genet*, 39, 479-81.
- NARANJO, J. R. & MELLSTROM, B. 2012. Ca²⁺-dependent transcriptional control of Ca²⁺ homeostasis. *J Biol Chem*, 287, 31674-80.
- NARAYANAN, R., DOUGHERTY, K. J. & JOHNSTON, D. 2010. Calcium store depletion induces persistent perisomatic increases in the functional density of h channels in hippocampal pyramidal neurons. *Neuron*, 68, 921-35.
- NEHER, E. & SAKABA, T. 2008. Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron*, 59, 861-72.
- NGUYEN, N., BIET, M., SIMARD, E., BELIVEAU, E., FRANCOEUR, N., GUILLEMETTE, G., DUMAINE, R., GRANDBOIS, M. & BOULAY, G. 2013. STIM1 participates in the contractile rhythmicity of HL-1 cells by moderating T-type Ca(2+) channel activity. *Biochim Biophys Acta*, 1833, 1294-303.
- NGUYEN, T. T., STEVENS, M. V., KOHR, M., STEENBERGEN, C., SACK, M. N. & MURPHY, E. 2011. Cysteine 203 of cyclophilin D is critical for cyclophilin D activation of the mitochondrial permeability transition pore. *J Biol Chem*, 286, 40184-92.
- NICHOLLS, D. G. 1978. Calcium transport and porton electrochemical potential gradient in mitochondria from guinea-pig cerebral cortex and rat heart. *Biochem J*, 170, 511-22.

- NICHOLLS, D. G., VESCE, S., KIRK, L. & CHALMERS, S. 2003. Interactions between mitochondrial bioenergetics and cytoplasmic calcium in cultured cerebellar granule cells. *Cell Calcium*, 34, 407-24.
- NIEMANN, A., HUBER, N., WAGNER, K. M., SOMANDIN, C., HORN, M., LEBRUN-JULIEN, F., ANGST, B., PEREIRA, J. A., HALFTER, H., WELZL, H., FELTRI, M. L., WRABETZ, L., YOUNG, P., WESSIG, C., TOYKA, K. V. & SUTER, U. 2014. The Gdap1 knockout mouse mechanistically links redox control to Charcot-Marie-Tooth disease. *Brain*.
- NIEMANN, A., RUEGG, M., LA PADULA, V., SCHENONE, A. & SUTER, U. 2005. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol*, 170, 1067-78.
- NIEMANN, A., RUEGG, M., LA PADULA, V., SCHENONE, A. & SUTER, U. 2005. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol*, 170, 1067-78.
- NIEMANN, A., WAGNER, K. M., RUEGG, M. & SUTER, U. 2009. GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis*, 36, 509-20.
- NITA, II, CASPI, Y., GUDES, S., FISHMAN, D., LEV, S., HERSFINKEL, M., SEKLER, I. & BINSHTOK, A. M. 2016. Privileged crosstalk between TRPV1 channels and mitochondrial calcium shuttling machinery controls nociception. *Biochim Biophys Acta*, 1863, 2868-2880.
- NOACK, R., FREDE, S., ALBRECHT, P., HENKE, N., PFEIFFER, A., KNOLL, K., DEHMEL, T., MEYER ZU HORSTE, G., STETTNER, M., KIESEIER, B. C., SUMMER, H., GOLZ, S., KOCHANISKI, A., WIEDAU-PAZOS, M., ARNOLD, S., LEWERENZ, J. & METHNER, A. 2012. Charcot-Marie-Tooth disease CMT4A: GDAP1 increases cellular glutathione and the mitochondrial membrane potential. *Hum Mol Genet*, 21, 150-62.
- NOTO, C., PAPPAGALLO, M. & SZALLASI, A. 2009. NGX-4010, a high-concentration capsaicin dermal patch for lasting relief of peripheral neuropathic pain. *Curr Opin Investig Drugs*, 10, 702-10.
- NOWIKOVSKY, K. & BERNARDI, P. 2014. LETM1 in mitochondrial cation transport. *Front Physiol*, 5, 83.
- NOWIKOVSKY, K., FROSCHAUER, E. M., ZSURKA, G., SAMAJ, J., REIPERT, S., KOLISEK, M., WIESENBERGER, G. & SCHWEYEN, R. J. 2004. The LETM1/YOL027 gene family encodes a factor of the mitochondrial K⁺ homeostasis with a potential role in the Wolf-Hirschhorn syndrome. *J Biol Chem*, 279, 30307-15.
- NOWIKOVSKY, K., POZZAN, T., RIZZUTO, R., SCORRANO, L. & BERNARDI, P. 2012. Perspectives on: SGP symposium on mitochondrial physiology and medicine: the pathophysiology of LETM1. *J Gen Physiol*, 139, 445-54.
- OLSON, M. L., CHALMERS, S. & MCCARRON, J. G. 2012. Mitochondrial organization and Ca²⁺ uptake. *Biochem Soc Trans*, 40, 158-67.
- O'NEILL, J., BROCK, C., OLESEN, A. E., ANDRESEN, T., NILSSON, M. & DICKENSON, A. H. 2012. Unravelling the mystery of capsaicin: a tool to understand and treat pain. *Pharmacol Rev*, 64, 939-71.

- PADUA, L., CAVALLARO, T., PAREYSON, D., QUATTRONE, A., VITA, G., SCHENONE, A. & ITALIAN, C. M. T. Q. S. G. 2008. Charcot-Marie-Tooth and pain: correlations with neurophysiological, clinical, and disability findings. *Neurol Sci*, 29, 193-4.
- PALMER, A. E., GIACOMELLO, M., KORTEEMME, T., HIRES, S. A., LEV-RAM, V., BAKER, D. & TSIEN, R. Y. 2006. Ca²⁺ indicators based on computationally redesigned calmodulin-peptide pairs. *Chem Biol*, 13, 521-30.
- PALTY, R., SILVERMAN, W. F., HERSHFINKEL, M., CAPORALE, T., SENSI, S. L., PARNIS, J., NOLTE, C., FISHMAN, D., SHOSHAN-BARMATZ, V., HERRMANN, S., KHANANSHVILI, D. & SEKLER, I. 2010. NCLX is an essential component of mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 436-41.
- PAN, X., LIU, J., NGUYEN, T., LIU, C., SUN, J., TENG, Y., FERGUSON, M. M., ROVIRA, II, ALLEN, M., SPRINGER, D. A., APONTE, A. M., GUCEK, M., BALABAN, R. S., MURPHY, E. & FINKEL, T. 2013. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter. *Nat Cell Biol*, 15, 1464-72.
- PAREKH, A. B. & PUTNEY, J. W., JR. 2005. Store-operated calcium channels. *Physiol Rev*, 85, 757-810.
- PAREKH, A. B. 2003. Store-operated Ca²⁺ entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol*, 547, 333-48.
- PAREYSON, D. & MARCHESI, C. 2009. Diagnosis, natural history, and management of Charcot-Marie-Tooth disease. *Lancet Neurol*, 8, 654-67.
- PARK, C. Y., SHCHEGLOVITOV, A. & DOLMETSCH, R. 2010. The CRAC channel activator STIM1 binds and inhibits L-type voltage-gated calcium channels. *Science*, 330, 101-5.
- PATRON, M., CHECCHETTO, V., RAFFAELLO, A., TEARDO, E., VECCELLIO REANE, D., MANTOAN, M., GRANATIERO, V., SZABO, I., DE STEFANI, D. & RIZZUTO, R. 2014. MICU1 and MICU2 finely tune the mitochondrial Ca²⁺ uniporter by exerting opposite effects on MCU activity. *Mol Cell*, 53, 726-37.
- PAZZAGLIA, C., VOLLONO, C., FERRARO, D., VIRDIS, D., LUPI, V., LE PERA, D., TONALI, P., PADUA, L. & VALERIANI, M. 2010. Mechanisms of neuropathic pain in patients with Charcot-Marie-Tooth 1 A: a laser-evoked potential study. *Pain*, 149, 379-85.
- PEDROLA, L., ESPERT, A., VALDES-SANCHEZ, T., SANCHEZ-PIRIS, M., SIRKOWSKI, E. E., SCHERER, S. S., FARINAS, I. & PALAU, F. 2008. Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med*, 12, 679-89.
- PELLEGRINI, C., ZULIAN, A., GUALANDI, F., MANZATI, E., MERLINI, L., MICHELINI, M. E., BENASSI, L., MARMIROLI, S., FERLINI, A., SABATELLI, P., BERNARDI, P. & MARALDI, N. M. 2013. Melanocytes--a novel tool to study mitochondrial dysfunction in Duchenne muscular dystrophy. *J Cell Physiol*, 228, 1323-31.
- PEROCCHI, F., GOHIL, V. M., GIRGIS, H. S., BAO, X. R., MCCOMBS, J. E., PALMER, A. E. & MOOTHA, V. K. 2010. MICU1 encodes a mitochondrial EF hand protein required for Ca²⁺ uptake. *Nature*, 467, 291-6.
- PERRY, G. M., TALLAKSEN-GREENE, S., KUMAR, A., HENG, M. Y., KNEYNSBERG, A., VAN GROEN, T., DETLOFF, P. J., ALBIN, R. L. & LESORT, M. 2010. Mitochondrial calcium uptake capacity as a

- therapeutic target in the R6/2 mouse model of Huntington's disease. *Hum Mol Genet*, 19, 3354-71.
- PETRONILLI, V., MIOTTO, G., CANTON, M., BRINI, M., COLONNA, R., BERNARDI, P. & DI LISA, F. 1999. Transient and long-lasting openings of the mitochondrial permeability transition pore can be monitored directly in intact cells by changes in mitochondrial calcein fluorescence. *Biophys J*, 76, 725-34.
- PETRONILLI, V., SZABO, I. & ZORATTI, M. 1989. The inner mitochondrial membrane contains ion-conducting channels similar to those found in bacteria. *FEBS Lett*, 259, 137-43.
- PFEIFFER, D. R., GUNTER, T. E., ELISEEV, R., BROEKEMEIER, K. M. & GUNTER, K. K. 2001. Release of Ca²⁺ from mitochondria via the saturable mechanisms and the permeability transition. *IUBMB Life*, 52, 205-12.
- PICH, S., BACH, D., BRIONES, P., LIESA, M., CAMPS, M., TESTAR, X., PALACIN, M. & ZORZANO, A. 2005. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet*, 14, 1405-15.
- PLA-MARTIN, D., CALPENA, E., LUPO, V., MARQUEZ, C., RIVAS, E., SIVERA, R., SEVILLA, T., PALAU, F. & ESPINOS, C. 2015. Junctophilin-1 is a modifier gene of GDAP1-related Charcot-Marie-Tooth disease. *Hum Mol Genet*, 24, 213-29.
- PLA-MARTIN, D., RUEDA, C. B., ESTELA, A., SANCHEZ-PIRIS, M., GONZALEZ-SANCHEZ, P., TRABA, J., DE LA FUENTE, S., SCORRANO, L., RENAU-PIQUERAS, J., ALVAREZ, J., SATRUSTEGUI, J. & PALAU, F. 2013. Silencing of the Charcot-Marie-Tooth disease-associated gene GDAP1 induces abnormal mitochondrial distribution and affects Ca²⁺ homeostasis by reducing store-operated Ca²⁺ entry. *Neurobiol Dis*, 55, 140-51.
- POPUGAEVA, E. & BEZPROZVANNY, I. 2013. Role of endoplasmic reticulum Ca²⁺ signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease. *Front Mol Neurosci*, 6, 29.
- PRAKRIYA, M. & LEWIS, R. S. 2015. Store-Operated Calcium Channels. *Physiol Rev*, 95, 1383-436.
- PUTNEY, J. W. 2009. Capacitative calcium entry: from concept to molecules. *Immunol Rev*, 231, 10-22.
- PUTNEY, J. W., JR. 1986. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*, 7, 1-12.
- QIAN, W. & VAN HOUTEN, B. 2010. Alterations in bioenergetics due to changes in mitochondrial DNA copy number. *Methods*, 51, 452-7.
- QUINTANA, A. & HOTH, M. 2012. Mitochondrial dynamics and their impact on T cell function. *Cell Calcium*, 52, 57-63.
- QUINTANA, A., PASCHE, M., JUNKER, C., AL-ANSARY, D., RIEGER, H., KUMMEROW, C., NUNEZ, L., VILLALOBOS, C., MERANER, P., BECHERER, U., RETTIG, J., NIEMEYER, B. A. & HOTH, M. 2011. Calcium microdomains at the immunological synapse: how ORAI channels, mitochondria and calcium pumps generate local calcium signals for efficient T-cell activation. *EMBO J*, 30, 3895-912.
- QUINTANA, A., SCHWINDLING, C., WENNING, A. S., BECHERER, U., RETTIG, J., SCHWARZ, E. C. & HOTH, M. 2007. T cell activation requires mitochondrial translocation to the immunological synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 14418-23.

- RAEYMAEKERS, P., TIMMERMAN, V., NELIS, E., DE JONGHE, P., HOOGENDIJK, J. E., BAAS, F., BARKER, D. F., MARTIN, J. J., DE VISSER, M., BOLHUIS, P. A. & ET AL. 1991. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord*, 1, 93-7.
- RAFFAELLO, A., DE STEFANI, D., SABBADIN, D., TEARDO, E., MERLI, G., PICARD, A., CHECCHETTO, V., MORO, S., SZABO, I. & RIZZUTO, R. 2013. The mitochondrial calcium uniporter is a multimer that can include a dominant-negative pore-forming subunit. *EMBO J*, 32, 2362-76.
- RASOLA, A. & BERNARDI, P. 2011. Mitochondrial permeability transition in Ca(2+)-dependent apoptosis and necrosis. *Cell Calcium*, 50, 222-33.
- REILLY, M. M., MURPHY, S. M. & LAURA, M. 2011. Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, 16, 1-14.
- RIERA, C. E., HUISING, M. O., FOLLETT, P., LEBLANC, M., HALLORAN, J., VAN ANDEL, R., DE MAGALHAES FILHO, C. D., MERKWIRTH, C. & DILLIN, A. 2014. TRPV1 pain receptors regulate longevity and metabolism by neuropeptide signaling. *Cell*, 157, 1023-36.
- RIZZUTO, R. 2003. The collagen-mitochondria connection. *Nat Genet*, 35, 300-1.
- RIZZUTO, R., DE STEFANI, D., RAFFAELLO, A. & MAMMUCARI, C. 2012. Mitochondria as sensors and regulators of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 13, 566-78.
- RODRIGUEZ-AGUILERA, J. C., CORTES, A. B., FERNANDEZ-AYALA, D. J. & NAVAS, P. 2017. Biochemical Assessment of Coenzyme Q10 Deficiency. *J Clin Med*, 6.
- RODRIGUEZ-HERNANDEZ, A., CORDERO, M. D., SALVIATI, L., ARTUCH, R., PINEDA, M., BRIONES, P., GOMEZ IZQUIERDO, L., COTAN, D., NAVAS, P. & SANCHEZ-ALCAZAR, J. A. 2009. Coenzyme Q deficiency triggers mitochondria degradation by mitophagy. *Autophagy*, 5, 19-32.
- ROSSOR, A. M., POLKE, J. M., HOULDEN, H. & REILLY, M. M. 2013. Clinical implications of genetic advances in Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Rev Neurol*, 9, 562-71.
- ROZA, C. & LOPEZ-GARCIA, J. A. 2008. Retigabine, the specific KCNQ channel opener, blocks ectopic discharges in axotomized sensory fibres. *Pain*, 138, 537-45.
- RUEDA, C. B., LLORENTE-FOLCH, I., TRABA, J., AMIGO, I., GONZALEZ-SANCHEZ, P., CONTRERAS, L., JUARISTI, I., MARTINEZ-VALERO, P., PARDO, B., DEL ARCO, A. & SATRUSTEGUI, J. 2016. Glutamate excitotoxicity and Ca-regulation of respiration: Role of the Ca activated mitochondrial transporters (CaMCs). *Biochim Biophys Acta*.
- RUEDA, C. B., TRABA, J., AMIGO, I., LLORENTE-FOLCH, I., GONZALEZ-SANCHEZ, P., PARDO, B., ESTEBAN, J. A., DEL ARCO, A. & SATRUSTEGUI, J. 2015. Mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SCA_{MC}-3/Slc25a23 counteracts PARP-1-dependent fall in mitochondrial ATP caused by excitotoxic insults in neurons. *J Neurosci*, 35, 3566-81.
- RUEDA, C. B., TRABA, J., AMIGO, I., LLORENTE-FOLCH, I., GONZALEZ-SANCHEZ, P., PARDO, B., ESTEBAN, J. A., DEL ARCO, A. & SATRUSTEGUI, J. 2015. Mitochondrial ATP-Mg/Pi carrier SCA_{MC}-3/Slc25a23 counteracts PARP-1-dependent fall in mitochondrial ATP caused by excitotoxic insults in neurons. *J Neurosci*, 35, 3566-81.
- RUIZ-MEDINA, J., BAULIES, A., BURA, S. A. & VALVERDE, O. 2013. Paclitaxel-induced neuropathic pain is age dependent and devolves on glial response. *Eur J Pain*, 17, 75-85.

- SABATELLI, P., PALMA, E., ANGELIN, A., SQUARZONI, S., URCIUOLO, A., PELLEGRINI, C., TIEPOLO, T., BONALDO, P., GUALANDI, F., MERLINI, L., BERNARDI, P. & MARALDI, N. M. 2012. Critical evaluation of the use of cell cultures for inclusion in clinical trials of patients affected by collagen VI myopathies. *J Cell Physiol*, 227, 2927-35.
- SAMTLEBEN, S., WACHTER, B. & BLUM, R. 2015. Store-operated calcium entry compensates fast ER calcium loss in resting hippocampal neurons. *Cell Calcium*, 58, 147-59.
- SANCAK, Y., MARKHARD, A. L., KITAMI, T., KOVACS-BOGDAN, E., KAMER, K. J., UDESHI, N. D., CARR, S. A., CHAUDHURI, D., CLAPHAM, D. E., LI, A. A., CALVO, S. E., GOLDBERGER, O. & MOOTHA, V. K. 2013. EMRE is an essential component of the mitochondrial calcium uniporter complex. *Science*, 342, 1379-82.
- SATRUSTEGUI, J. & BAK, L. K. 2015. Fluctuations in Cytosolic Calcium Regulate the Neuronal Malate-Aspartate NADH Shuttle: Implications for Neuronal Energy Metabolism. *Neurochem Res*, 40, 2425-30.
- SATRUSTEGUI, J., PARDO, B. & DEL ARCO, A. 2007. Mitochondrial transporters as novel targets for intracellular calcium signaling. *Physiol Rev*, 87, 29-67.
- SCHNEIDER, R., HOSY, E., KOHL, J., KLUEVA, J., CHOQUET, D., THOMAS, U., VOIGT, A. & HEINE, M. 2015. Mobility of calcium channels in the presynaptic membrane. *Neuron*, 86, 672-9.
- SCHWINDLING, C., QUINTANA, A., KRAUSE, E. & HOTH, M. 2010. Mitochondria positioning controls local calcium influx in T cells. *J Immunol*, 184, 184-90.
- SELVARAJ, S., SUN, Y., WATT, J. A., WANG, S., LEI, S., BIRNBAUMER, L. & SINGH, B. B. 2012. Neurotoxin-induced ER stress in mouse dopaminergic neurons involves downregulation of TRPC1 and inhibition of AKT/mTOR signaling. *J Clin Invest*, 122, 1354-67.
- SELVARAJ, S., WATT, J. A. & SINGH, B. B. 2009. TRPC1 inhibits apoptotic cell degeneration induced by dopaminergic neurotoxin MPTP/MPP(+). *Cell Calcium*, 46, 209-18.
- SENDEREK, J., BERGMANN, C., STENDEL, C., KIRFEL, J., VERPOORTEN, N., DE JONGHE, P., TIMMERMAN, V., CHRAST, R., VERHEIJEN, M. H., LEMKE, G., BATTALOGU, E., PARMAN, Y., ERDEM, S., TAN, E., TOPALOGU, H., HAHN, A., MULLER-FELBER, W., RIZZUTO, N., FABRIZI, G. M., STUHRMANN, M., RUDNIK-SCHONEBORN, S., ZUCHNER, S., MICHAEL SCHRODER, J., BUCHHEIM, E., STRAUB, V., KLEPPER, J., HUEHNE, K., RAUTENSTRAUSS, B., BUTTNER, R., NELIS, E. & ZERRES, K. 2003. Mutations in a gene encoding a novel SH3/TPR domain protein cause autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4C neuropathy. *Am J Hum Genet*, 73, 1106-19.
- SENFT, D. & RONAI, Z. A. 2015. UPR, autophagy, and mitochondria crosstalk underlies the ER stress response. *Trends Biochem Sci*, 40, 141-8.
- SEVILLA, T., JAIJO, T., NAUFFAL, D., COLLADO, D., CHUMILLAS, M. J., VILCHEZ, J. J., MUELAS, N., BATALLER, L., DOMENECH, R., ESPINOS, C. & PALAU, F. 2008. Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. *Brain*, 131, 3051-61.
- SHAW, P. J. & FESKE, S. 2012. Regulation of lymphocyte function by ORAI and STIM proteins in infection and autoimmunity. *J Physiol*, 590, 4157-67.

- SHAW, P. J., QU, B., HOTH, M. & FESKE, S. 2013. Molecular regulation of CRAC channels and their role in lymphocyte function. *Cell Mol Life Sci*, 70, 2637-56.
- SHIN, C. Y., SHIN, J., KIM, B. M., WANG, M. H., JANG, J. H., SURH, Y. J. & OH, U. 2003. Essential role of mitochondrial permeability transition in vanilloid receptor 1-dependent cell death of sensory neurons. *Mol Cell Neurosci*, 24, 57-68.
- SHIN, D. M. & MUALLEM, S. 2010. What the mitochondria see. *Mol Cell*, 39, 6-7.
- SIM, A. T., HERD, L., PROCTOR, D. T., BALDWIN, M. L., MEUNIER, F. A. & ROSTAS, J. A. 2006. High throughput analysis of endogenous glutamate release using a fluorescence plate reader. *J Neurosci Methods*, 153, 43-7.
- SIMPSON, D. M., BROWN, S., TOBIAS, J. & GROUP, N.-C. S. 2008. Controlled trial of high-concentration capsaicin patch for treatment of painful HIV neuropathy. *Neurology*, 70, 2305-13.
- SIVERA, R., ESPINOS, C., VILCHEZ, J. J., MAS, F., MARTINEZ-RUBIO, D., CHUMILLAS, M. J., MAYORDOMO, F., MUELAS, N., BATALLER, L., PALAU, F. & SEVILLA, T. 2010. Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Peripher Nerv Syst*, 15, 334-44.
- SIVERA, R., SEVILLA, T., VILCHEZ, J. J., MARTINEZ-RUBIO, D., CHUMILLAS, M. J., VAZQUEZ, J. F., MUELAS, N., BATALLER, L., MILLAN, J. M., PALAU, F. & ESPINOS, C. 2013. Charcot-Marie-Tooth disease: genetic and clinical spectrum in a Spanish clinical series. *Neurology*, 81, 1617-25.
- SKIBINSKA-KIJEK, A., WISNIEWSKA, M. B., GRUSZCZYNSKA-BIEGALA, J., METHNER, A. & KUZNICKI, J. 2009. Immunolocalization of STIM1 in the mouse brain. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 69, 413-28.
- SKRE, H. 1974. Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease. *Clin Genet*, 6, 98-118.
- SMYTH, J. T., HWANG, S. Y., TOMITA, T., DEHAVEN, W. I., MERCER, J. C. & PUTNEY, J. W. 2010. Activation and regulation of store-operated calcium entry. *J Cell Mol Med*, 14, 2337-49.
- SONG, J., LEE, J. H., LEE, S. H., PARK, K. A., LEE, W. T. & LEE, J. E. 2013. TRPV1 Activation in Primary Cortical Neurons Induces Calcium-Dependent Programmed Cell Death. *Exp Neurobiol*, 22, 51-7.
- SRIKANTH, S. & GWACK, Y. 2013. Orai1-NFAT signalling pathway triggered by T cell receptor stimulation. *Mol Cells*, 35, 182-94.
- STEINBECK, J. A., HENKE, N., OPATZ, J., GRUSZCZYNSKA-BIEGALA, J., SCHNEIDER, L., THEISS, S., HAMACHER, N., STEINFARZ, B., GOLZ, S., BRUSTLE, O., KUZNICKI, J. & METHNER, A. 2011. Store-operated calcium entry modulates neuronal network activity in a model of chronic epilepsy. *Exp Neurol*, 232, 185-94.
- STOCK, K., KUMAR, J., SYNOWITZ, M., PETROSINO, S., IMPERATORE, R., SMITH, E. S., WEND, P., PURFURST, B., NUBER, U. A., GUROK, U., MATYASH, V., WALZLEIN, J. H., CHIRASANI, S. R., DITTMAR, G., CRAVATT, B. F., MOMMA, S., LEWIN, G. R., LIGRESTI, A., DE PETROCELLIS, L., CRISTINO, L., DI MARZO, V., KETTENMANN, H. & GLASS, R. 2012. Neural precursor cells induce cell death of high-grade astrocytomas through stimulation of TRPV1. *Nat Med*, 18, 1232-8.
- SZABADKAI, G. & DUCHEN, M. R. 2008. Mitochondria: the hub of cellular Ca²⁺ signaling. *Physiology (Bethesda)*, 23, 84-94.

- SZALLASI, A. & BLUMBERG, P. M. 1999. Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacol Rev*, 51, 159-212.
- SZOLCSANYI, J., SZALLASI, A., SZALLASI, Z., JOO, F. & BLUMBERG, P. M. 1990. Resiniferatoxin: an ultrapotent selective modulator of capsaicin-sensitive primary afferent neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 255, 923-8.
- TAKEMURA, H. & PUTNEY, J. W., JR. 1989. Capacitative calcium entry in parotid acinar cells. *Biochem J*, 258, 409-12.
- TARGOS, B., BARANSKA, J. & POMORSKI, P. 2005. Store-operated calcium entry in physiology and pathology of mammalian cells. *Acta Biochim Pol*, 52, 397-409.
- TEKMEN, M. & GLEASON, E. 2010. Multiple Ca^{2+} -dependent mechanisms regulate L-type Ca^{2+} current in retinal amacrine cells. *J Neurophysiol*, 104, 1849-66.
- TER KEURS, H. E. 2012. The interaction of Ca^{2+} with sarcomeric proteins: role in function and dysfunction of the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 302, H38-50.
- THOMAS, R. R., KEENEY, P. M. & BENNETT, J. P. 2012. Impaired complex-I mitochondrial biogenesis in Parkinson disease frontal cortex. *J Parkinsons Dis*, 2, 67-76.
- TOOTH, H. H. 1886. *The Peroneal Type of Progressive Muscular Atrophy*, London, Lewis, H.K.
- TRABA, J., DEL ARCO, A., DUCHEN, M. R., SZABADKAI, G. & SATRUSTEGUI, J. 2012. S_{Ca}MC-1 promotes cancer cell survival by desensitizing mitochondrial permeability transition via ATP/ADP-mediated matrix Ca^{2+} buffering. *Cell Death Differ*, 19, 650-60.
- TRABA, J., DEL ARCO, A., DUCHEN, M. R., SZABADKAI, G. & SATRUSTEGUI, J. 2012. S_{Ca}MC-1 promotes cancer cell survival by desensitizing mitochondrial permeability transition via ATP/ADP-mediated matrix Ca^{2+} buffering. *Cell Death Differ*, 19, 650-60.
- TRABA, J., FROSCHAUER, E. M., WIESENBERGER, G., SATRUSTEGUI, J. & DEL ARCO, A. 2008. Yeast mitochondria import ATP through the calcium-dependent ATP-Mg/Pi carrier Sal1p, and are ATP consumers during aerobic growth in glucose. *Mol Microbiol*, 69, 570-85.
- TREMML, G., SINGER, M. & MALAVARCA, R. 2008. Culture of mouse embryonic stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*, Chapter 1, Unit 1C 4.
- TREVILLYAN, J. M., CHIOU, X. G., CHEN, Y. W., BALLARON, S. J., SHEETS, M. P., SMITH, M. L., WIEDEMAN, P. E., WARRIOR, U., WILKINS, J., GUBBINS, E. J., GAGNE, G. D., FAGERLAND, J., CARTER, G. W., LULY, J. R., MOLLISON, K. W. & DJURIC, S. W. 2001. Potent inhibition of NFAT activation and T cell cytokine production by novel low molecular weight pyrazole compounds. *J Biol Chem*, 276, 48118-26.
- TSAI, M. F., JIANG, D., ZHAO, L., CLAPHAM, D. & MILLER, C. 2014. Functional reconstitution of the mitochondrial $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ antiporter Letm1. *J Gen Physiol*, 143, 67-73.
- VASEVA, A. V., MARCHENKO, N. D., JI, K., TSIRKA, S. E., HOLZMANN, S. & MOLL, U. M. 2012. p53 opens the mitochondrial permeability transition pore to trigger necrosis. *Cell*, 149, 1536-48.
- VAY, L., HERNANDEZ-SANMIGUEL, E., SANTO-DOMINGO, J., LOBATON, C. D., MORENO, A., MONTERO, M. & ALVAREZ, J. 2007. Modulation of Ca^{2+} release and Ca^{2+} oscillations in HeLa cells and fibroblasts by mitochondrial Ca^{2+} uniporter stimulation. *J Physiol*, 580, 39-49.

- VÁZQUEZ-FONSECA, L., SANTOS-OCAÑA, C., ARTUCH, R., RIBES, A., CASCAJO, M.V., GUTIÉRREZ-RÍOS, P., MATTE, C., NAVAS-ENAMORADO, I., SÁNCHEZ-CUESTA, A., BREA-CALVO, G., NAVAS, P. 2016. Insuficiencia de ADCK2 causa miopatía asociada a deficiencia de coenzima Q y defecto en el metabolismo de ácidos grasos. Castelldefels, Barcelona: IX Reunión Anual CIBERER.
- VERKAART, S., KOOPMAN, W. J., CHEEK, J., VAN EMST-DE VRIES, S. E., VAN DEN HEUVEL, L. W., SMEITINK, J. A. & WILLEMS, P. H. 2007a. Mitochondrial and cytosolic thiol redox state are not detectably altered in isolated human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 1041-51.
- VERKAART, S., KOOPMAN, W. J., VAN EMST-DE VRIES, S. E., NIJTMANS, L. G., VAN DEN HEUVEL, L. W., SMEITINK, J. A. & WILLEMS, P. H. 2007b. Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency. *Biochim Biophys Acta*, 1772, 373-81.
- WAGNER, K. M., RUEGG, M., NIEMANN, A. & SUTER, U. 2009. Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One*, 4, e5160.
- WANG, W., FANG, H., GROOM, L., CHENG, A., ZHANG, W., LIU, J., WANG, X., LI, K., HAN, P., ZHENG, M., YIN, J., WANG, W., MATTSON, M. P., KAO, J. P., LAKATTA, E. G., SHEU, S. S., OUYANG, K., CHEN, J., DIRKSEN, R. T. & CHENG, H. 2008. Superoxide flashes in single mitochondria. *Cell*, 134, 279-90.
- WANG, Y., DENG, X., MANCARELLA, S., HENDRON, E., EGUCHI, S., SOBOLOFF, J., TANG, X. D. & GILL, D. L. 2010. The calcium store sensor, STIM1, reciprocally controls Orai and CaV1.2 channels. *Science*, 330, 105-9.
- WHEELER, D. G., GROTH, R. D., MA, H., BARRETT, C. F., OWEN, S. F., SAFA, P. & TSIEN, R. W. 2012. Ca(V)1 and Ca(V)2 channels engage distinct modes of Ca(2+) signaling to control CREB-dependent gene expression. *Cell*, 149, 1112-24.
- WU, J., RYSKAMP, D. A., LIANG, X., EGOROVA, P., ZAKHAROVA, O., HUNG, G. & BEZPROZVANNY, I. 2016. Enhanced Store-Operated Calcium Entry Leads to Striatal Synaptic Loss in a Huntington's Disease Mouse Model. *J Neurosci*, 36, 125-41.
- WU, J., SHIH, H. P., VIGONT, V., HRDLICKA, L., DIGGINS, L., SINGH, C., MAHONEY, M., CHESWORTH, R., SHAPIRO, G., ZIMINA, O., CHEN, X., WU, Q., GLUSHANKOVA, L., AHLIJANIAN, M., KOENIG, G., MOZHAYEVA, G. N., KAZNACHEYEVA, E. & BEZPROZVANNY, I. 2011. Neuronal store-operated calcium entry pathway as a novel therapeutic target for Huntington's disease treatment. *Chem Biol*, 18, 777-93.
- XIA, J., PAN, R., GAO, X., MEUCCI, O. & HU, H. 2014. Native store-operated calcium channels are functionally expressed in mouse spinal cord dorsal horn neurons and regulate resting calcium homeostasis. *J Physiol*, 592, 3443-61.
- ZAMZAMI, N., MAISSE, C., METIVIER, D. & KROEMER, G. 2001. Measurement of membrane permeability and permeability transition of mitochondria. *Methods Cell Biol*, 65, 147-58.
- ZHAO, R. & TSANG, S. Y. 2017. Versatile Roles of Intracellularly Located TRPV1 Channel. *J Cell Physiol*, 232, 1957-1965.
- ZIMMERMANN, K., HEIN, A., HAGER, U., KACZMAREK, J. S., TURNQUIST, B. P., CLAPHAM, D. E. & REEH, P. W. 2009. Phenotyping sensory nerve endings in vitro in the mouse. *Nat Protoc*, 4, 174-96.

- ZIMON, M., BAETS, J., FABRIZI, G. M., JAAKKOLA, E., KABZINSKA, D., PILCH, J., SCHINDLER, A. B., CORNBLATH, D. R., FISCHBECK, K. H., AUER-GRUMBACH, M., GUELLY, C., HUBER, N., DE VRIENDT, E., TIMMERMAN, V., SUTER, U., HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ, I., NIEMANN, A., KOCHANOSKI, A., DE JONGHE, P. & JORDANOVA, A. 2011. Dominant GDAP1 mutations cause predominantly mild CMT phenotypes. *Neurology*, 77, 540-8.
- ZORATTI, M., DE MARCHI, U., BIASUTTO, L. & SZABO, I. 2010. Electrophysiology clarifies the megariddles of the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett*, 584, 1997-2004.
- ZUCHNER, S., MERSIYANOVA, I. V., MUGLIA, M., BISSAR-TADMOURI, N., ROCHELLE, J., DADALI, E. L., ZAPPIA, M., NELIS, E., PATITUCCI, A., SENDEREK, J., PARMAN, Y., EVGRAFOV, O., JONGHE, P. D., TAKAHASHI, Y., TSUJI, S., PERICAK-VANCE, M. A., QUATTRONE, A., BATTALOGU, E., POLYAKOV, A. V., TIMMERMAN, V., SCHRODER, J. M. & VANCE, J. M. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*, 36, 449-51.
- ZULIAN, A., TAGLIAVINI, F., RIZZO, E., PELLEGRINI, C., SARDONE, F., ZINI, N., MARALDI, N. M., SANTI, S., FALDINI, C., MERLINI, L., PETRONILLI, V., BERNARDI, P. & SABATELLI, P. 2014. Melanocytes from Patients Affected by Ullrich Congenital Muscular Dystrophy and Bethlem Myopathy have Dysfunctional Mitochondria That Can be Rescued with Cyclophilin Inhibitors. *Front Aging Neurosci*, 6, 324.

